

**ZUR AUSSCHIEDUNG DER RENAL-TUBULÄREN ENZYME
N-ACETYL-B-D-GLUCOSAMINIDASE
UND ALANINAMINOPEPTIDASE IM URIN
BEIM DIABETES MELLITUS UND BEIM
EXPERIMENTELLEN AKUTEN NIERENVERSAGEN**

Disbui. München

1988

Cornelia H. Preuss



Aus dem Klinisch-chemischen Institut des
Städtischen Krankenhauses München-Schwabing
Vorstand: Prof. Dr. med. Otto H. Wieland

Zur Ausscheidung der renal-tubulären Enzyme
N-acetyl- β -D-Glucosaminidase
und
Alaninaminopeptidase
im Urin
beim Diabetes mellitus
und beim experimentellen akuten Nierenversagen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Cornelia H. Preuss
München
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Walter G. Guder

.....

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Maximilian Knedel

Prof. Dr. med. Peter Schwandt

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:.....-----

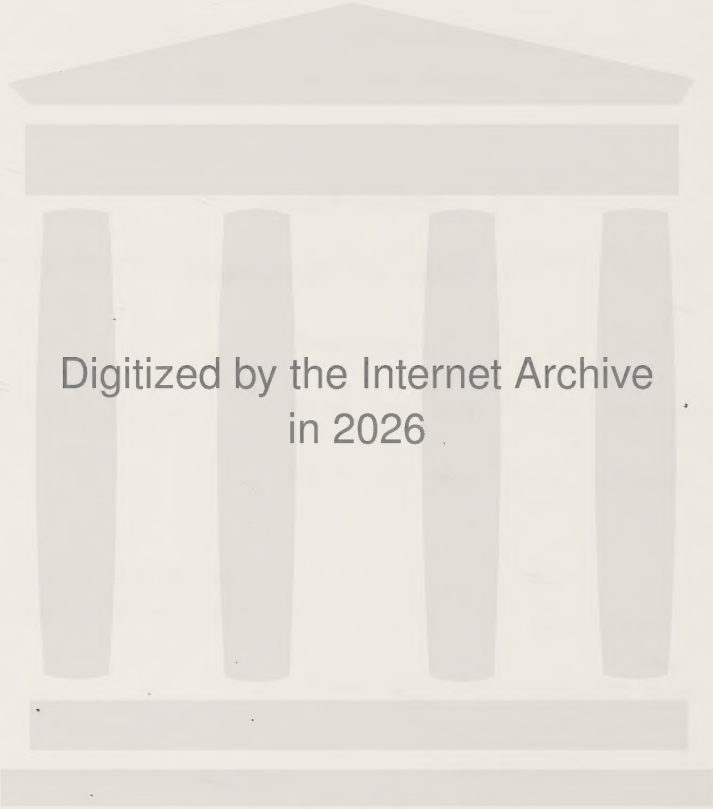
Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.1988

Meinen Eltern

in Liebe und Dankbarkeit

gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0048

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Walter G. G u d e r, meinem Doktorvater, herzlich danken der nicht nur Thema und Aufgabe dieser Arbeit gestellt, hat, sondern in allen Phasen der Entstehung ein geduldiger und verständnisvoller Begleiter war. Dabei hat er, in vielfach kurzfristig ermöglichten Besprechungen, immer wieder Zeit gefunden, die angefallenen Fragen und Probleme zu erörtern, Schwierigkeiten zu beseitigen, sowie durch zahlreiche Anregungen neue Perspektiven zu eröffnen. Besonders hilfreich waren auch seine wertvollen Hinweise und seine Unterstützung bei der Durcharbeitung der internationalen Fachliteratur, die das Eindringen in die komplexe Thematik wesentlich erleichtert haben.

Mein besonderer Dank gilt auch den Herren Dr. med. E. E d e l m a n n, ED. Dr. med. H. D i e n e m a n n und Dr. med. U. H e s s e. Ihr kollegialer Beistand und die Überlassung ihrer Forschungsergebnisse ermöglichte mir eine breiter fundierte Auswertung meiner Arbeit. Freundschaftlich erwähnt sei in diesem Zusammenhang auch mein Kollege und Mit-Doktorand W. G e r s t n e r.

Nicht weniger dankbar bin ich Frau Dr. med. K. von R e u s s. Sie stellte mir, in der schwierigen Situation während und nach der Übersiedelung von Herrn Prof. Guder mit seinem Forschungslabor an das Städtische Krankenhaus

München-Bogenhausen, einen Laborplatz zur Verfügung. Zusammen mit ihren Mitarbeiterinnen unterstützte sie mich außerdem bei den Messungen der Albumin- und Creatinin-konzentrationen.

In meinen Dank möchte ich ferner Frau S. P ü r s c h l - v o n d e r B u r g und Herrn Dipl. Physiker K.-F. G e r b e r (seinerzeit Zivildienstleistender). Ihnen oblagen die Vorarbeiten für die Enzymaktivitätsbestimmungen. Neben Frau Pürschl-von der Burg halfen auch Frau Dr. G. W i r t h e n s o n und Frau S. L e f r a n k beim Erlernen der Labortechniken und bei der statistischen Auswertung.

Wertvolle Ergänzungen zu meinen Untersuchungen lieferte auch das Forschungslabor Schleicher-Wieland (Glycosylierte Serumproteine, Hb A₁). Besonders hervorgehoben seien Frau W a g n e r und die stets freundliche Frau S c i k o r a - K l e e.

Nicht zuletzt möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Otto H. W i e l a n d danken, der in einem ersten, ausführlichen Gespräch mein Interesse für diese Arbeit geweckt und mich Herrn Prof. Dr. Guder empfohlen hat.

Inhaltsverzeichnis

A. Enzymaktivitätsbestimmungen im Urin

1. Historische Entwicklung der Urinenzymologie	1
2. Herkunft von Enzymaktivitäten im Urin	4
3. N-acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG) und Alanin- aminopeptidase (AAP)	9
•N-acetyl- β -D-Glucosaminidase	9
•Alaninaminopeptidase	12

B. Themenstellung und Ziele der eigenen Arbeit

C. Methodik

1. Patientenauswahl und Untersuchungen im Rahmen der Diabetiker-Studie	16
•Langzeitstudie mit Typ-I-Diabetikern	16
•Akute Stoffwechselentgleisung bei Typ-II-Dia- betikern	20
2. Versuchsanordnung beim experimentellen akuten Nierenversagen an Hunden	22
•Adeninnucleotid-Infusion bei uni-nephrekto- mierten Tieren	22
•Adeninnucleotid-Infusion bei Tieren mit beid- seits erhaltenen Nieren	24

3. Messung der Harnenzymaktivitäten von NAG und AAP	27
•Vorbereitung des Nativ-Urins	27
•Photometrische Messung der NAG-Aktivität	30
•Photometrische Messung der AAP-Aktivität	33
4. Bestimmung zusätzlicher Parameter	36
•Diabetiker-Studie	36
•Experimentelles akutes Nierenversagen an Hunden	36
5. Statistische Methoden	40
•Kontrolle der Analyseergebnisse	40
•Statistische Testverfahren	41
 D. <u>Ergebnisse</u>	
1. Ergebnisse zur Methodik	42
•Stabilität der für die Enzymaktivitätsbestimmungen verwendeten Materialien und Reagenzien	42
•Präzisionen der angewandten Bestimmungsverfahren für die Enzymaktivitäten von NAG und AAP und die Konzentrationen von Creatinin, Albumin und denen der glycosylierten Serumproteine	44
2. Ergebnisse zur Diabetiker-Studie	47
•Langzeitstudie mit Typ-I-Diabetikern	47
-Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen	47
-Stoffwechseleinstellung und Diabetesdauer	49
-Nierenfunktion	60
-Retinopathie	64

•Akute Stoffwechselentgleisung bei Typ-II-Diabetikern	68
-Patientin B., Ch., 69 Jahre	68
-Patient Sch., H., 48 Jahre	71
3. Ergebnisse zum experimentellen akuten Nierenversagen an Hunden	73
•Adeninnucleotid-Infusion bei uni-nephrektomierten Tieren	73
-Glomeruläre Filtrationsrate, Harnzeitvolumen und Creatininkonzentration im Urin	80
-Enzymurien von NAG und AAP	82
-Effekte der post-ischämischen intra-renalen Infusion von ATP-MgCl ₂ oder Adenosin	85
•Adeninnucleotid-Infusion bei Tieren mit beidseits erhaltenen Nieren	87
-Glomeruläre Filtrationsrate, Harnzeitvolumen, Creatininkonzentration im Urin und Enzymurien von NAG und AAP	87
-Histologische Untersuchungen	95
 E. <u>Diskussion</u>	
1. Methodik	97
2. Enzym- und Albuminurie beim Diabetes mellitus	100
3. Enzymurie beim experimentellen akuten Nierenversagen	105
 F. <u>Zusammenfassung</u>	109
G. <u>Literaturverzeichnis</u>	111
H. <u>Anhang</u>	124

A. Enzymaktivitätsbestimmungen im Urin

1. Historische Entwicklung der Urinenzymologie

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten hat bis heute in erster Linie im Rahmen von Blutuntersuchungen Eingang in die moderne Medizin gefunden. Demgegenüber spielt die Enzymdiagnostik im Urin eine noch eher untergeordnete Rolle. Die Ursachen dafür sind vielfältig. Als besonders erschwerend erwies sich der Umstand, daß die Interpretation von Urin-Enzymaktivitäten vergleichsweise komplizierter erscheint (Lit.: 57). Dies ist deshalb bemerkenswert, weil die ersten Grundlagen für die Serum- und Urinenzymologie gemeinsam im ausgehenden 19. Jahrhundert gelegt wurden. Eine der frühesten Arbeiten dieser Epoche, 1861 von E. Brücke veröffentlicht, befaßte sich mit der peptischen Aktivität (Uropepsinogen) im Urin (Lit.: 56).

In den folgenden Jahrzehnten stand die Suche nach weiteren, noch unbekannten Enzymen im Vordergrund. Bis 1972 konnten etwa 40 verschiedene Nierenenzyme im Harn nachgewiesen werden (Lit.: 56).

Doch schon 1909, als Wohlgemuth die Vermehrung der Diastase (α -Amylase) in Harn und Blutserum bei einer akuten Pankreasnekrose beschrieb, zeigte sich, daß erhöhte Enzymurien nicht nur als Folge von Nieren-



erkrankungen, sondern auch durch andere krankhafte Prozesse im Körper ausgelöst werden können (Lit.: 8;23). In der Zwischenzeit sind Hyperenzymurien bei verschiedensten Organ- und Systemerkrankungen (z.B. Hyperthyreose, Myokardinfarkt, Ulcus duodeni, akute Virushepatitis, Diabetes mellitus, Hypertonie, rheumatoide Erkrankungen und Speicherkrankheiten), sowie nach medikamentösen Therapien (v.a. mit diversen Cytostatica, Antibiotika und Phenacetinen) bekannt geworden (Lit.: 5-8; 10-14;17;18;31;34;35;48;49;52;55;59;61;63;67;68).

Einen entscheidenden Impuls erhielt die klinische Enzymologie in der 2. Hälfte dieses Jahrhunderts durch Standardisierung und Vereinfachung labortechnischer Methoden (z.B. durch die photometrische Messung von Enzymaktivitäten mit Hilfe von Substraten, die Farbstoffe freisetzen), die eine schnellere und präzisere Enzymaktivitätsmessung erlauben. Hinzu kamen Verbesserungen durch Ausschaltung interferierender Substanzen und durch Automatisierung der Verfahren (Lit.: 3;35;38;41; 50;65;66).

In den letzten 20 Jahren ermöglichten quantitativ-histochemische Untersuchungen der Niere Einblicke in die Verteilung von Schlüsselenzymen entlang dem Nephron. Damit wurde eine segmentspezifische Kompartimentierung des Nierenstoffwechsels aufgedeckt (Lit.: 20;23;31-33; 53;60;63).

Alle diese Erkenntnisse und Entwicklungen führten schließlich zu umfangreichen pathophysiologischen Über-

legungen über Mechanismen der Enzymausscheidung im
Urin und zu neuen Gesichtspunkten der diagnostischen
Beurteilung von Hyperenzymurien (Lit.: 7;8;22;29;33;
35-37;53;54;57-59;63;69).

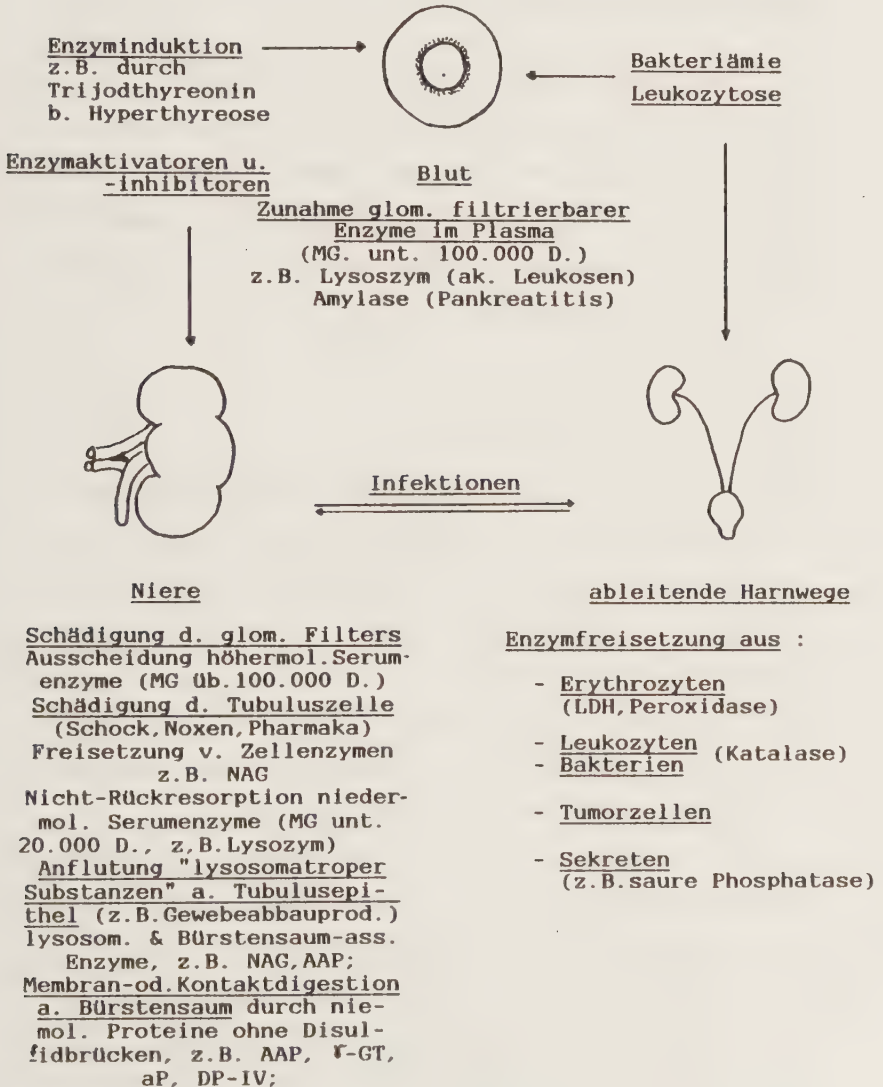
2. Herkunft von Enzymaktivitäten im Urin

In der Literatur (4-8;44;57-59) werden zahlreiche Faktoren diskutiert von denen angenommen wird, daß sie die Ausscheidung von Enzymen im Urin beeinflussen können (siehe dazu Abb. 1). Man unterscheidet:

a. prärenale Enzymurien :

Plasmaproteine und -enzyme mit einem Molekulargewicht von weniger als 60 bis 80.000 Dalton (Lit.:126) werden in der Niere glomerulär filtriert und treten in den Primärharn über. Da sie nach enzymatischer Spaltung unter physiologischen Bedingungen von den Tubuluszellen größtenteils rückresorbiert werden, erscheinen sie nur in geringen Mengen im Endharn. Deshalb gibt es nur wenige Serumenzyme, deren reguläre renale Ausscheidung im Urin meßbare Quantitäten annimmt. Diese Schwelle kann - unter pathologischen Voraussetzungen - überschritten werden, wenn vermehrt glomerulär filtrierbare Enzyme im Serum auftreten und die Spaltungs- und Resorptionskapazität der Tubuluszellen nicht mehr ausreichend ist. Diagnostische Bedeutung werden dem Lysozym und der α -Amylase zugeschrieben (Lit.: 8;23;44;56-58). Für diese Enzyme ist charakteristisch, daß ihre Serumaktivitäten bei eingeschränkter glomerulärer Filtration (Urämie) ansteigen.

Ursachen veränderter Enzymausscheidungen im Urin
bei Inneren Erkrankungen



b. renale Enzymurien:

glomeruläre Enzymurien

Eine Schädigung des glomerulären Filters kann dazu führen, daß auch höher-molekulare (über 60-80.000 Dalton) Proteine und Enzyme in die Nierentubuli gelangen und nur teilweise rückresorbiert werden. Damit ist neben einer erhöhten Protein- auch eine verstärkte Enzymurie zu erwarten (Lit.: 56-58).

tubuläre Enzymurien

Bei Betrachtung der organspezifischen Nierenenzyme müssen bezüglich ihrer Lokalisation zwei Gruppen unterschieden werden: Die intrazellulären Tubulusenzyme (z.B. NAG) werden dann vermehrt in den Urin freigesetzt, wenn ihr 'zellulärer Umsatz' erhöht ist. Als mögliche Ursachen kommen, neben hormonellen und funktionellen Einflüssen, auch toxische und hypoxische Zellschädigungen in Frage (Lit.: 7-11;28;29;36;44;53;56-58).

Bei anderen Enzymen, die auf der Oberfläche des tubulären Bürstensaums lokalisiert sind, wird vermutet, daß ihre Ablösung schon unter dem Einfluß von 'Detergentien' (z.B. Gallensäuren und niedermolekularen Proteinen) durch 'Membran- oder Kontaktdigestion' (Lit.:8) oder durch entzündliche Prozesse (Lit.: 59) erfolgen kann. Scherberich und Mondorf sprechen von 'einer Gruppe multifunktionell organisierter Enzyme, die nach limi-

tierter proteolytischer Andauung in individuelle Einheiten desintegrieren'. Als Beispiele nennen sie die Alaninaminopeptidase (AAP) und die γ -Glutamyl-Transpeptidase (γ -Gt) (Lit.: 59).

Unter physiologischen Bedingungen werden im Rahmen der ständig stattfindenden Zellerneuerungs- und Umbauvorgänge Tubulusepithelien abgestoßen. Ihre Enzyme erscheinen jedoch nur teilweise im Urin, weil ein Teil zerstört (z.B. die Succinat-Dehydrogenase) oder inaktiviert wird. Ähnliches gilt für den Bürstensaum und seine Enzyme (Lit.: 56-58).

Tubuluszellnekrosen, die am häufigsten durch Noxen (z.B. Cytostatica, Aminoglycosid-Antibiotica, Röntgenkontrastmittel) oder Sauerstoffmangel (z.B. im Schockzustand) verursacht werden (Lit.: 11-13;15;18;48;56-59), führen nicht nur zu erhöhten Ausscheidungen von Harnenzyemen aus der Niere, sie können auch tubuläre Resorptionsstörungen bewirken. Dabei hängen Art und Ausmaß der gemessenen Enzymaktivitäten entscheidend ab von:

- Intensität und Einwirkungsdauer der Noxe bzw. der Ischämie,
- dem Enzymmuster des betroffenen Nierenabschnitts
- der Lokalisation der Enzyme innerhalb der geschädigten Zelle, bzw. ihrer Strukturbindung
- physikalisch-chemischen Eigenschaften der Enzymproteine (u.a. Größe, Form) (Lit.: 56-58)

c. postrenale Enzymurien:

Hyperenzymurien sind auch im Zusammenhang mit Zelluntergängen im Bereich der ableitenden Harnwege bekannt. Als wichtigste Enzymquellen werden Leukozyten und Erythrocyten (insbesondere LDH und Peroxidase) und Bakterien (Katalase) genannt (Lit.: 8;44:56-59).

Durch Zerfall epithelialer Tumorzellen der ableitenden Harnwege gelangt auch deren Enzymausstattung in den Urin. Es wurden u.a. erhöhte Werte der LDH und der alkalischen Phosphatase gemessen (Lit.: 13;44:56-58). Sie erwiesen sich jedoch in Bezug auf den Malignitätsgrad des Tumors als unspezifisch (Lit.: 57;58).

Unter physiologischen Bedingungen wurden für einige Enzyme geschlechtsspezifische Ausscheidungsunterschiede festgestellt. Von wesentlicher Bedeutung waren höhere Enzymaktivitäten bei Männern, welche durch Sekretenzyme aus der Prostata (saure Phosphatase), der Spermaflüssigkeit (GOT und GPT) und den Präputialdrüsen (β -Glucuronidase) verursacht werden (Lit.: 8;23:56-58).

3. N-acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG) und Alaninamino- peptidase (AAP)

3.1. N-acetyl- β -D-Glucosaminidase (E.C. 3.2.1.30):

Innerhalb der Enzymhauptklasse der Hydrolasen gehört die N-acetyl- β -D-Glucosaminidase zur Unterklasse der Glucosidasen. Sie katalysiert die hydrolytische Spaltung der endständigen Glucosaminbindung von nicht-geradzah-
ligen Oligosacchariden, so daß N-acetyl-Glucosamin und die nächstniedrigen, geradzahligen Oligosaccharide entstehen. Dabei werden sowohl N-acetyl- β -Glucosaminide als auch N-acetyl- β -Galactosaminide hydrolysiert (Lit.: 1;128). Im anglo-amerikanischen Schrifttum erscheint das Enzym auch unter der Bezeichnung β -N-acetyl-Hexosaminidase (Lit.: 24;64;127).

Als wichtigste physikalische Kenngrößen werden in der Literatur (1;) u.a. genannt:

Molekulargewicht	150 bis 160.000 Dalton
ph-Optimum	4,3 bis 5,3

Die NAG zählt zu den lysosomalen und damit intrazellulären Enzymen und wurde in zahlreichen menschlichen Gewe-
ben nachgewiesen, darunter in der Niere, in der Leber, im Gehirn und im Bindegewebe (Lit.: 20;60;62). Innerhalb der Niere ist sie in den Tubuluszellen lokalisiert. Bei Menschen und Versuchstieren wurden die höchsten Enzymaktivitäten in der Pars recta und in der Pars convoluta des proximalen Tubulus gefunden. In den papil-

lären und medullären Sammelrohren und distalen Tubuli waren die Werte dagegen geringer.

Es werden zwei Isoenzyme A und B unterschieden. Ihre Isolierung aus menschlichem Nierengewebe mit Hilfe der Ionen-Austausch-Chromatographie auf DEAE-Zellulose führte zu der Erkenntnis, daß die A-Form überwiegend in den lumennahen Lysosomen der Tubuluszellen, die B-Form auf den Ribosomen und zwei Intermediär-Formen, I_1 und I_2 , im Golgi-Apparat vorhanden sind. Es wurde angenommen, daß die B-Form schrittweise durch Sialylierung (Anhängen von N-acetyl-Neuraminsäure-Resten an eine Kohlenhydrat-Seitenkette) in die A-Form überführt wird. Dabei sollen die Zwischenprodukte (Intermediärformen) zunächst im Golgi-Apparat gelagert werden, ehe sie, umgewandelt in die A-Form, endgültig in die Lysosomen verpackt werden (Lit.: 4;26;33).

Als physiologische Substrate der NAG wurden Glycolipide, Glycoproteine, Proteoglycane und Zuckernucleotide postuliert oder beschrieben (Lit.: 24;64;124;127). Die GM-2-Gangliosidosen sind durch Gangliosid-Ablagerungen, vorzugsweise im Gehirn, in der Leber und in der Milz, sowie durch erhöhte Ausscheidungen dieser Stoffwechselprodukte im Urin gekennzeichnet. Ihre Entstehung wird entweder auf einen Mangel oder auf das absolute Fehlen des NAG-Isoenzyms A (Typ-I: Tay-Sachs) oder beider Iso-Enzyme A und B (Typ II: Sandhoff) zurückgeführt (Lit.: 64;124;127).

Die Bezeichnung 'Mucopolysaccharidose' ist ein Sammelbe-

griff für Störungen im Abbau von sulfatierten Glucosaminoglycanen. Ursächlich kommen dafür Mängel oder Defekte jeweils fünf verschiedener Sulfatasen in Betracht, wobei abnorme Akkumulationen von Heparin, Keratan, Dermatan oder dessen Isomer Chondroitinsulfat im Gewebe auftreten können. Daneben finden sich erhöhte Ausscheidungen dieser Substanzen im Urin. In einer kürzlich veröffentlichten Publikation (Lit.: 24) wird die Theorie vertreten, daß die im Harn zusätzlich als vermehrt gemessenen sulfatierten N-acetyl-Glucos- und -Galactosamine als Spaltprodukte der NAG-Isoenzym-A-Aktivität im Glucosaminoglycan-Katabolismus anzusehen wären.

Während bei gesunden Erwachsenen im Serum nur das Isoenzym A nachgewiesen werden konnte, zeigten im Urin beide Isoenzyme meßbare Quantitäten. Das Verhältnis A:B-Form wurde mit 4:1 ermittelt. Bei Kindern schien es leicht zu gunsten des B-Isoenzyms verschoben. Der Harnanteil der Intermediärformen I_1 und I_2 lag unter 2 % (Lit.: 33;53;63).

Als Normalwerte für die Gesamtausscheidung der NAG im Urin wurden - bei Verwendung von p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-Glucosaminid als Substrat - bezogen auf die Creatininkonzentration im Harn, 0,27-1,18 U/mmol Crea. (Frauen) bzw. 0,19-1,06 U/mmol (Männer) angegeben (Lit.: 12), das entspricht 2-10 U/g Crea. . Die Werte beziehen sich auf Meßbedingungen bei 37 °C und einen pH von 4,4 der Pufferlösung.

3.2. Alaninaminopeptidase (E.C. 3.4.11.2 früher 3.4.1.2)

Ebenso wie die NAG, ist die Alaninaminopeptidase eine Vertreterin der Hydrolasen. Sie ist Mitglied einer Gruppe von Enzymen mit der gleichen Code-Nummer in der internationalen Enzymnomenklatur, die die Abspaltung von α -Aminosäuren von Peptiden, Amiden und p-Nitroaniliden katalysieren, wobei sekundäre Amidbindungen nicht hydrolysiert werden (Lit.: 128). In der neueren Literatur wird diese Enzymgruppe unter den Bezeichnungen 'Aminopeptidase N' (Lit.: 32;36) oder 'Aminosäure-Aryl-Amidase' als ein Enzym mit Abspaltungspräferenz für Alanin (nicht dagegen Prolin) aufgefaßt (Lit.: 3).

Ihre wichtigsten physikalischen Kenngrößen sind (Lit.: 1-3):

Molekulargewicht	240.000 Dalton
ph-Optimum	6 - 8

Innerhalb der Niere gehört die AAP zu den tubulären Bürstensaumenzymen. Nach jüngeren Erkenntnissen scheint sie Bestandteil 'multifunktionell organisierter Enzyme' auf der Mikrovilli-Oberfläche zu sein (Lit.: 49;59). Außerhalb der Niere konnte die AAP auch in anderen Organen, z.B. in der Leber, im Pankreas und in der Dünndarmschleimhaut, sowie in Blutzellen (Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten) nachgewiesen werden (Lit.: 23;32).

Die Serumagarosegel-Elektrophorese ermöglichte die Differenzierung zweier Isoenzyme in der α_1 - und β -Bande

(Lit.: 23). Wegen ihres Molekulargewichts von über 80.000 (s.o.) wird die AAP bei intakter Nierenfunktion nicht glomerulär filtriert (Lit.: 12;126). Trotz der für den Tagesverlauf beschriebenen Ausscheidungsschwankungen des Enzyms im Urin, mit einem Maximum in den Vormittagsstunden, lassen entsprechende Untersuchungen vermuten, daß die individuelle Gesamtsekretion pro 24 h, bezogen auf das Nierengewicht, konstant ist (Lit.: 49;50). Bei Verwendung von D-/L-Alanin-p-nitroanilid als Substrat und der Creatininkonzentration im Harn als Bezugsgröße, liegen die Normalwerte für die AAP-Aktivitäten im Urin zwischen 0,24 und 0,55 U/mmol Crea. (Frauen) bzw. 0,32 und 0,75 U/mmol Crea. (Männer) (Lit.: 12); dies entspricht 2-6 U/g Crea. (colorimetrische Bestimmung bei 37°C und einem pH der Pufferlösung von 7,2).

B. Themenstellung und Ziele der eigenen Arbeit

Am Beispiel der diabetischen Nephropathie und des experimentellen, ischämischen Nierenversagens, befassen sich die vorliegenden Untersuchungen mit den Folgen einer chronischen und einer akuten Nierenschädigung auf die Ausscheidung tubulärer Nierenenzyme. Wegen ihrer Stabilität und der bereits entwickelten, standardisierten Testbedingungen wurden exemplarisch die beiden Enzyme N-acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG) und Alaninaminopeptidase (AAP) ausgewählt. Auf ihre charakteristischen Eigenschaften, Herkunftsorte und Ausscheidungsspezifitäten wurde im vorherigen Abschnitt näher eingegangen.

Diabetes mellitus:

In einer längerfristig angelegten Studie wurden Typ-I-Diabetiker über 1 Jahr regelmäßig 1x monatlich ambulant einbestellt und untersucht. Neben Einflüssen der Stoffwechseleinstellung, der Diabetesdauer und der Entwicklung vaskulärer Spätkomplikationen (Retinopathie) auf die Ausscheidung der Nierenenzyme und des Albumins im Urin, sollte geklärt werden, ob diese Parameter zur Früherkennung einer diabetischen Nephropathie beitragen können. Daneben stellte sich die Frage, in wie weit sich akute Stoffwechselentgleisungen auf diese

Untersuchungsgrößen auswirken würden. Deshalb wurden zwei Patienten in die Studie einbezogen, die mit einer plötzlichen Stoffwechseldekompensation in die Klinik aufgenommen und behandelt worden waren.

Experimentelles, akutes Nierenversagen:

Durch Zusammenarbeit mit dem Physiologischen Institut ergab sich die Möglichkeit, im Rahmen eines tierexperimentellen Modellversuchs an Hunden, Enzymurien in der Erholungsphase eines akuten, ischämischen Nierenversagens zu messen. Dabei war zu prüfen, ob sich die erwarteten günstigen Effekte postischämisch applizierter Adeninnucleotide in der Enzymausscheidung widerspiegeln würden.

C. Methodik

1. Patientenauswahl und Untersuchungen im Rahmen der Diabetiker-Studie

1.1. Langzeitstudie mit Typ-I-Diabetikern:

Im Verlauf eines Jahres wurden 42 Patienten der III. Medizinischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing mit insulinpflichtigem Diabetes mellitus, Typ I (17 weibliche, 25 männliche Probanden) einmal monatlich einbestellt, untersucht und die Entwicklung diabetischer Spätkomplikationen über diesen Zeitraum hinweg beobachtet.

Als Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie sollten schwere Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems und der Nieren, sowie das Vorliegen einer diabetischen Makroangiopathie ausgeschlossen sein (altersentsprechende Blutdruckwerte, Konzentration des Serum-Creatinins im Normbereich und Pulsstatus ohne pathologischen Befund).

Bei 15 Patienten war die Erkrankung 'Diabetes mellitus' wenige Monate vor Beginn der Studie diagnostiziert worden, ohne daß sich Hinweise für eine Retinopathia diabetica ergeben hätten (Gruppe I - 'Erstmanifestation'). Von den übrigen Patienten mit einer Krank-

Übersicht: Langzeitstudie - Typ-I-Diabetiker

	<u>Patienten</u>	<u>Alter</u>	<u>Diabetesdauer</u>
	(n)	(Jahre)	(Jahre)
Diabetesdauer			
I. <u>unter</u> 1 Jahr/ <u>keine</u> Retinopathie (Erstmanife- station)	15	13 bis 43 22,4 ± 7,6	---
II. <u>über</u> 1 Jahr/ <u>keine</u> Retinopathie	5	19 bis 44 28,6 ± 10,1	2 bis 30 11,4 ± 11,7
III. <u>über</u> 1 Jahr <u>plus</u> Retinopathie			
<u>Retinopathie</u>	I 7	24 bis 53 37,6 ± 11,4	2 bis 43 17,6 ± 12,9
<u>Retinopathie</u>	II 10	21 bis 43	1 bis 25
u. I-II		30,8 ± 7,6	15,4 ± 7,5
<u>Retinopathie</u>	III 3	21 bis 45	1 bis 25
u. II-III		29,3 ± 13,5	15,0 ± 13,1
<u>Retinopathie</u>	IV 2	30 bzw. 44	26 bzw. 37

heitsdauer von 1 Jahr zeigten 22 Augenhintergrundveränderungen im Sinne dieser Spätkomplikation (Gruppe III; Kriterien für die Stadieneinteilung der Retinopathia diabetica s. Tab. 2), 5 Studienteilnehmer hatten einen unauffälligen Augenbefund (Gruppe II). Einen Überblick über die Zusammensetzung des Patientenkollektivs gibt die Tabelle Nr. 1.

Die Insulin-Therapie geschah bei 19 Patienten durch Subcutan-Injektionen, die anderen 23 waren Insulin-Pumpen-Träger der Typen 'Promedos' (Siemens, München) und 'Auto-Syringe' (Auto-Syringe Inc., Hooksett, N.H.). Es wurde sowohl Schweine-, als auch Human-Insulin der Firmen 'Hoechst' und 'Lilly' appliziert.

Die Aktivitätsbestimmungen der Nierenenzyme NAG und AAP erfolgten aus dem 2. Morgenurin (Sammelperiode ca. 7-10 h) des Untersuchungstages. Zur weiteren Verifizierung beginnender nephropathischer Veränderungen wurden Albumin- und Proteinurie erfaßt und die glomeruläre Filtrationsrate berechnet. Messungen der glycosylierten Anteile des Hämoglobins (Hb A_1) und der Serumproteine (GSP) im Blut, sowie der Glucos- und Ketonurien ermöglichten Aussagen über die Qualität der Stoffwechseleinstellung (methodische Details siehe unter 4.).

Kriterien zur Beurteilung und Stadieneinteilung der
Retinopathia diabetica

Retinopathie I : Mikroaneurysmen

Retinopathie II : Exsudate, streifige Blutungen

Retinopathie III : Entwicklung irreversibler Fundus-
veränderungen:

Gefäßproliferationen und

Gefäßneubildungen

II - III : beginnende Gefäßproliferation -
Lasertherapie

Retinopathie IV : Gefäßproliferationen in den
Glaskörper - zunehmende Erblindung

Einteilung nach Dr. R. Adamczyk, Universitäts-Augenklinik,
München

1.2. Akute Stoffwechselentgleisung bei Typ-II-Diabetikern

Um den Einfluß einer akuten Stoffwechselentgleisung und deren Normalisierung unter stationärer Behandlung auf die Ausscheidung der tubulären Nierenenzyme NAG und AAP sowie des Albumins im Urin zu untersuchen, wurden exemplarisch zwei Typ-II-Diabetiker ausgewählt. Bei beiden war die Erkrankung schon längere Zeit bekannt. Eine augenärztliche Untersuchung ergab jedoch keine Hinweise für eine diabetische Retinopathie.

Die adipöse, 69-jährige Patientin B.,CH. befand sich seit etwa 10 Jahren wegen ihres Diabetes mellitus in ärztlicher Behandlung. Im Zusammenhang mit einem ca. 2 Wochen zurückgelegenen, grippalen Infekt (Fieber um 39°C, Husten, Appetitlosigkeit, BKS 88/103), kam es zu einer plötzlichen Stoffwechsel-Dekompensation mit postprandialen Blutzuckerwerten bis 400 mg/dl und pathologischen Glucos- und Ketonurien. Während des 12-tägigen stationären Aufenthalts erhielt sie eine Reduktionsdiät und Euglucon N. Zwischen dem 5. und 9. Tag mußte zusätzlich Depot-Insulin verordnet werden.

Bei dem 48-jährigen Patienten Sch.,H. wurde die Krankheit 'Diabetes mellitus' bereits 4 Jahre vorher diagnostiziert, blieb jedoch unbehandelt. Nun wurde er mit Anzeichen einer Stoffwechselentgleisung (allgemeine Müdigkeit, Polyurie und Polydipsie, postprandialen Blutzuckerwerten über 330 mg/dl, Gewichtsabnahme von 10 kg, Potenzstörungen und Verminderung der Sehschärfe

innerhalb von 2 Monaten) in die Klinik eingewiesen. Die Therapie bestand in einer kalorien-reduzierten Diät und medikamentöser Einstellung auf Euglucon N. Nach 10 Tagen konnte der Patient nach Hause entlassen werden.

In die Studie gingen die Messungen der Harnausscheidung von NAG, AAP und Albumin, das Urinzeitvolumen und die Harn- und Blutzuckerkonzentrationen ein.

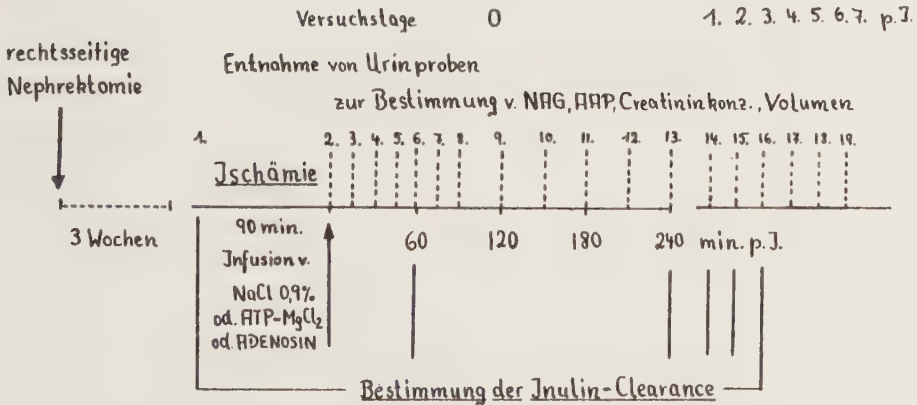
2. Versuchsanordnungen beim experimentellen, akuten Nierenversagen an Hunden

Im Rahmen eines von Dienemann, Hesse und Mitarbeitern (Chirurgische Poliklinik und Physiologisches Institut der Universität München) durchgeführten Modellversuchs an Bastardhunden, sollte die postischämische Erholung der Nierenfunktion nach Gabe von Adeninnucleotiden untersucht werden (Lit.: 114-118). Zwei verschiedene Versuchsreihen wurden angesetzt:

2.1. Adeninnucleotid-Infusion bei uni-nephrektomierten Tieren:

Bei wachen Tieren (N_1 -16; Körpergewicht 11-17 kg) wurde 3 Wochen nach rechtsseitiger Nephrektomie die Blutversorgung der verbliebenen Niere, nach Infusion von Heparin, mit einer transcutan ausgeleiteten, aufblasbaren Ballonmanschette an der A. renalis für 90 min. unterbrochen. Die Nierenperfusion wurde über eine elektromagnetische Flußsonde, in der A. renalis zwischen Aorta und Manschette plaziert, kontrolliert. Unmittelbar nach Freigabe der Zirkulation erhielten 6 Tiere ATP-MgCL₂ (50 μ mol/kg KG), 5 Tiere Adenosin (50 μ mol/kg KG) und 5 Kontrolltiere ein entsprechendes Volumen NaCl 0,9 % über einen Katheter in der Aorta thoracica in die A. renalis sin. infundiert (Infusionsdauer 30

Durchführung der Versuche beim experimentellen, akuten
Nierenversagen an Hunden

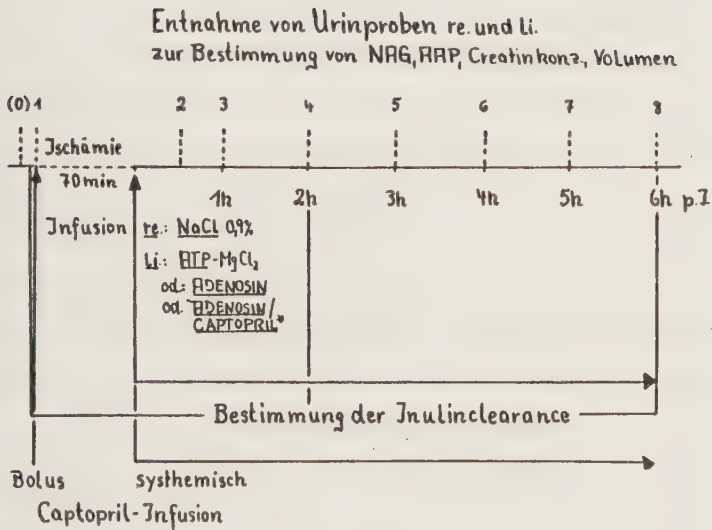


- a. postischämische, intrarenale Adeninucleotid- bzw. NaCl-Infusion bei uni-nephrektomierten Tieren

bis 45 min.). Die Tiere wurden 2-7 Tage nachbeobachtet (s. Abb. 2).

2.2. Adeninnucleotid-Infusion bei Tieren mit beidseits erhaltenen Nieren:

Aus der Literatur (111;113;119;123) ist bekannt, daß in die A. renalis applizierte Adeninnucleotide nach einer Nierenpassage überwiegend als Kreislauf-unwirksame Metaboliten im Blut vorliegen. Deshalb ergab sich für einen zweiten Versuchsansatz an narkotisierten (Pentobarbital 30 mg/kg KG) und mechanisch beatmeten Hunden (N_2 -16; Körpergewicht 18-27 kg) die Möglichkeit, die eine Niere als Test-, die andere als Kontrollorgan zu nützen. Zur Überprüfung möglicher vasokonstriktorischer Wirkungen des Adenosins mit Verzögerung der Erholung der Nierenfunktion, wurde bei einer Adenosin-infundierten Gruppe vor Erzeugung der Ischämie ein Bolus (330 µg/kg KG) und während der Versuchsdauer von 6 h systemisch (330 µg/kg KG/h) der Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer Captopril verabreicht. Nach gleichzeitiger Öffnung der Ballonmanschette an beiden Nierenarterien (Ischämiedauer 70 min.), bekamen alle Tiere über einen Zeitraum von 90 min. in die rechte A. renalis NaCl 0,9 % (1,2 ml/kg KG) und in die linke A. renalis entweder ATP-MgCl₂ (6 Tiere; Dosierung 6,6 nmol/kg/min.), oder Adenosin, oder Adenosin bei Captopril-Vorbehandlung,



- b. postischämische Adeninnucleotid- (A. ren. sin.) bzw. NaCl-Infusion (A. ren. dext.) bei Tieren mit beidseits erhaltenen Nieren

infundiert (jeweils 5 Tiere; Dosierung 6,6 nmol/kg/min.) Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 6 Stunden (s. Abb. 3).

Die für die Harnaktivitätsbestimmungen von NAG und AAP erforderlichen Urinproben wurden aus den Ureteren über Katheter gewonnen. Die Sammelperioden dauerten, unmittelbar vor Unterbrechung der Nierendurchblutung (v.I.) und innerhalb der 1. folgenden Stunde (p.I.) 15 (1. Versuchsreihe) bzw. 30 min. (2. Versuchsreihe), danach 30 min. . In der 1. Versuchsreihe wurden bis zum 7. postischämischen Tag einmal pro 24 h zusätzliche Proben abgenommen.

Zu den glomerulären und tubulären Funktionsgrößen, deren Verlauf über den Beobachtungszeitraum kontrolliert wurden, gehörten die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), die fraktionelle Natrium-Reabsorption, das Harnkonzentrationsvermögen und das Urinzeitvolumen. Die Blut- und Urinentnahmen erfolgten über Katheter im rechten Vorhof des Herzens und wiederum in den Ureteren (s.o.). Abschließend wurden Nieren aus der 2. Versuchsreihe histologisch untersucht.

3. Messung der Harnenzymaktivitäten von NAG und AAP

3.1. Vorbereitung des Nativ-Urins:

Nach ihrer Gewinnung wurden jeweils 10 ml von den Diabetiker-Urinen in vorbereitete Reagenzgläser gefüllt, deren Wände mit 10 µl 20 %-iger Rinderalbumin-Lösung in 0,9 % NaCl benetzt waren. Danach wurden sie 10 min. lang zentrifugiert. (10.000 x g), mit NaHCO₃ neutralisiert und bis zur weiteren Analyse bei -30 °C aufbewahrt.

Unmittelbar vor Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden die Proben vorsichtig aufgetaut und durch Gelfiltration von niedermolekularen Substanzen befreit. Das gegenüber dem Nativ-Urin um 1:2 (F= 0,5) verdünnte Eluat war für die Enzym- und Albuminmessungen geeignet. Als Material für die übrigen Harnparameter (Creatinin-konzentration bzw. Untersuchungen mit Combur-9-Teststreifen, s. unter 4.) wurden, sofort nach ihrer Abnahme, nicht-mit-Albumin-vorbehandelte Urine verwendet.

Gelfiltration

Das hier angewandte Verfahren basiert auf einer Beschreibung von Knoll et al. (Lit.: 35).

Materialien und Lösungen:

- Sephadex-G-25-M-Fertigsäulen
- NaCl-Lösung 0.9 %, mit und ohne Zusatz von Natriumazid (200 mg/l)

Durchführung:

Vor dem Gebrauch mußten die Sephadex-25-M-Fertigsäulen mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung (20-30 ml) equilibriert werden. Dann wurden sie jeweils mit 2 ml zentrifugiertem Urin überschichtet und mit 500 µl NaCl-Lösung gespült. Das Filtrat wurde verworfen.

Die in der Säule verbliebenen Enzyme konnten nun mit 4 ml physiologischer NaCl-Lösung ausgewaschen und das erhaltene Eluat der Enzym- und Albuminbestimmung zugeführt werden.

Abschließend wurde die Säule mit 10 bis 20 ml NaCl-Lösung entweder für den sofortigen Wiedergebrauch gereinigt, oder mit dem gleichen Volumen dieser Lösung, der 200 mg/l Natriumazid zugesetzt war, regeneriert.

Aus meßtechnischen Gründen (s. Diskussion) mußte dieses Verfahren für die Hunde-Urine modifiziert werden: Die Proben waren nach ihrer Gewinnung bei -30 °C eingefroren worden. Statt sie nach dem Auftauen zu gelfiltrieren, wurden sie mit $H_2O_{\text{dest.}}$ auf 1:6 bis 1:24 verdünnt und zentrifugiert (2 min. bei 10.000 X g). Der Verdünnungsquotient war abhängig von der Höhe der

Enzymaktivität in der Probe und von der Konzentration der in ihr enthaltenen Urochrome.

3.2. Photometrische Messung der NAG-Aktivität:

Für die Bestimmung der Harnaktivitäten der NAG wurde ebenfalls eine von Knoll et al. veröffentlichte Methode gewählt (Lit.: 35):

Prinzip: Die NAG katalysiert die Hydrolyse des Substrats p-Nitrophenyl- β -D-Glucosaminid zu p-Nitrophenol und N-acetyl-Glucosamin, wobei die freigesetzte p-Nitrophenolmenge proportional der Enzymaktivität in der zu untersuchenden Probe ist. Aus der photometrisch gemessenen Extinktionszunahme bei 405 nm Hg kann die Enzymaktivität berechnet werden (s.u.).

Reagenzien und Lösungen:

- Citronensäure/Citrat-Puffer, pH 4,4:

Herstellung aus 56 ml 0,1 M Citronensäure (10,5 g/500 ml H₂O_{dest.}) und 44 ml Trinatriumcitrat-2-hydrat-Lösung (14,7 g/500 ml H₂O_{dest.}).

- Substrat-Lösung (10 mmol/l):

342,3 mg p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-Glucosaminid werden in 100 ml Citronensäure/Citrat-Puffer gelöst.

- "Stopp-Lösung":

2-Amino-2-methyl-1-propanol-Puffer, 0,75 M pH 10,25:

66,86 g 2-Amino-2-methyl-1-propanol werden in 1 l H₂O mit konzentrierter HCl auf pH 10,25 titriert.

Durchführung:

Als Material für die NAG-Aktivitätsbestimmungen dienten die aus den Diabetiker-Urinen hergestellten Eluate (Verdünnungsfaktor $F = 0,5$) und die auf 1:6 bis 1:24 verdünnten Hunde-Urine.

Je 200 μl der Probe wurden mit 200 μl Substratlösung bei 37 °C inkubiert und die Reaktion exakt nach 15 min. durch Zugabe von 200 μl "Stopp-Lösung" und Verschiebung des pH's in den alkalischen Bereich abgebrochen. Die Extinktion des als Reaktionsprodukt entstandenen, gelben p-Nitrophenolats konnte am Eppendorf-Photometer bei 405 nm Hg gegen den jeweiligen Proben-Leerwert abgelesen werden. In diesem war die enzymatische Reaktion durch Zusatz der "Stopp-Lösung" vor der Substratlösung verhindert worden.

Berechnung der Enzymaktivität:

$$\begin{aligned} \text{NAG (U/l)} &= \frac{\Delta E/15 \text{ min.} \times \text{Test-Vol. [ml]} \times F^{-1}}{\xi \times 15 \text{ min.} \times \text{Probe-Vol. [ml]}} = \\ &= \frac{\Delta E/15 \text{ min.} \times 0,6 \times F^{-1}}{18,5 \times 10^{-3} \times 15 \times 0,2} = \\ &= \Delta E/15 \text{ min.} \times F^{-1} \times 10,81 ; \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{mit } \xi &= 18,5 \times 10^{+3} \text{ l/mol} \times \text{cm} = \\ &= 18,5 \times 10^{-3} \text{ l/}\mu\text{mol} \times \text{cm}; \end{aligned}$$

und F -: Verdünnungsfaktor der Probe;

In der Diabetiker-Studie wurde die Enzymaktivität (U/l) auf die in der Probe enthaltenen Creatininkonzentration (g/l), bei den Hunde-Versuchen zusätzlich auf das Urinzeitvolumen (ml/min.) bezogen. Damit ergaben sich für die Enzymaktivität die 'neuen' Einheiten "U/g Crea." und "mU/min."

3.3. Photometrische Messung der AAP-Aktivität:

Das hier angewandte Verfahren entspricht einer Modifikation der in der Literatur (3;11;27;48;50) beschriebenen Methoden.

Prinzip: Die AAP katalysiert die hydrolytische Spaltung von D-/L-Alanin-p-nitroanilid zu D-/L-Alanin und gelbgefärbtem p-Nitroanilid. Dabei besteht ein mathematisch-physikalisch formulierbarer Zusammenhang zwischen der freigesetzten Farbstoffmenge, d.h. der bei 405 nm Hg photometrisch meßbaren Extinktionszunahme und der Enzymaktivität in der Probe (s.u.).

Reagenzien und Lösungen:

- Tris-Puffer, pH 7,2:

50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (3,03 g/500 ml H₂O dest.) werden mit konzentrierter HCl auf den pH= 7,2 eingestellt.

- Substrat-Lösung (1,2 mmol/l):

29,48 mg D-/L-Alanin-p-nitroanilid werden in 100 ml 50 mM Tris-Puffer gelöst.

Durchführung:

In der temperierten Küvette eines Eppendorf-Photometers reagierten je 100 µl Eluat bzw. verdünnter Hunde-

Urin mit 500 μ l Substratlösung bei 37°C.

Bei den Eluaten wurde die Extinktion nach genau 30 min. abgelesen. In jeder Testreihe liefen Referenzproben mit, die anstelle des Eluats 100 μ l enzymfreie, physiologische NaCl-Lösung enthielten. Die enzymatisch bedingte Extinktionszunahme errechnete sich durch Bildung der Differenz zwischen den Extinktionswerten der Eluate und denen der NaCl-Lösung.

Für die Bestimmung der AAP-Aktivität in den Hunde-Urinen wurde das Verfahren so modifiziert, daß die Extinktionsänderung direkt von einem an das Photometer angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet wurde. Ihr Wert, bezogen auf die Reaktionszeit von 30 min., konnte aus der Steigung der Kurve ermittelt und in die Berechnungsformel für die Enzymaktivität eingesetzt werden.

Berechnung der Enzymaktivität:

$$\text{AAP (U/l)} = \frac{\Delta E/30 \text{ min.} \times \text{Test-Vol. [ml]} \times F^{-1}}{\xi \times 30 \text{ min.} \times \text{Probe-Vol. [ml]}} =$$

$$= \frac{\Delta E/30 \text{ min.} \times 0,6 \times F^{-1}}{9,62 \times 10^{-3} \times 30 \times 0,1} =$$

$$\Delta E/30 \text{ min.} \times F^{-1} \times 20,8 ;$$

$$\text{mit } \xi = 9,62 \times 10^{-3} \text{ l/mol} \times \text{cm} =$$

$$= 9,62 \times 10^{-3} \text{ l/}\mu\text{mol} \times \text{cm}; \quad (\text{für pH} = 7,2)$$

und F = Verdünnungsfaktor der Probe;

Die berechnete Enzymaktivität (U/l) wurde durch die Creatininkonzentration der Urin-Probe (Diabetiker-Studie) bzw. zusätzlich durch das Urinzeitvolumen (Hunde-Versuche) dividiert. Als 'neue' Einheiten ergaben sich die Bezeichnungen "U/g Crea." und "mU/min." .

4. Bestimmung zusätzlicher Parameter

4.1. Diabetiker-Studie:

Von den ergänzend durchgeführten Untersuchungen gehören die Bestimmung der Harn- (bzw. Serum-) Konzentrationen von Creatinin und Albumin methodisch zum Routineprogramm des klinisch-chemischen Labors des Krankenhauses München-Schwabing. Sie wurden von diesem übernommen. Die Messungen der glycosylierten Anteile des Hämoglobins HbA₁ und der Serumproteine GSP im Blut fanden in den Laboratorien der 'Forschergruppe Diabetes' statt. Dies gilt auch für die semi-quantitativen Nachweise von Glucos-, Keton- und Proteinurien mittels Teststreifen. Normalwerte für den Menschen, methodische Grundlagen der angewandten Verfahren und Literaturangaben sind in nebenstehenden Tabellen (Nr. 3 und 4) zusammenfassend dargestellt.

4.2. experimentelles, akutes Nierenversagen an Hunden:

Als Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion in der postischämischen Erholungsphase ermittelten Diemann, Hesse und Mitarbeiter (Lit.: 114-118) die Inulin-clearance, die Serum- und Urinkonzentrationen von Creatinin und Natrium, Plasma- und Urin-Osmolarität und das

Übersicht: Bestimmung zusätzlicher Parameter im Rahmen
der Diabetiker-Studie

1. zur Beurteilung der Stabilität des Stoffwechsels:

	<u>Verfahren</u>	<u>Normalbereich</u>	<u>Lit.:</u>
<u>glyc. Hämoglobin</u> Hb A ₁	Affinitäts- chromatographie	5-8 %	70-74 76
<u>glyc. Serum- proteine</u> GSP	HPLC	6,5 nmol/Lys- Gluc./mg Protein	79
<u>Glucosurie</u> (semi-quantitativ)	Combur-9-Test ^R Boehringer, Mannh.	bis 15 mg/100 ml	81-83
<u>Ketonurie</u> (semi-quantitativ)	Combur-9-Test ^R Boehringer, Mannh.	---	81-83

2. zur Eliminierung nicht-Stoffwechsel-bedingter Hyperenzymurien:

<u>Leukozyturie</u>	Combur-9-Test ^R Boehringer, Mannh.	bis 20 Leukos/l	81-83
<u>Nitriturie</u>		negativ	
<u>Erythrozyturie</u> (semi-quantitativ)		3-5 Erys/l	

3. zur Beurteilung der Nierenfunktion:

	<u>Verfahren</u>	<u>Normalbereich</u>	<u>Lit.:</u>
<u>Creatinin-</u> <u>konzentration</u> im			
Blutserum	Jaffé-Reaktion (n. Dialyse)	w.: 0,5-0,9 mg/dl	84
Urin		m.: 0,6-1,1 mg/dl 0,7-1,5 g/dl	
<u>glom. Filtrations-</u> <u>rate</u> GFR*	---	70-120 ml/min.	125
"endogene Creati- ninclearance"			
<u>Proteinurie</u> (semi-quantitativ)	Combur-9-Test ^R Boehringer, Mannh.	bis 30 mg/100 ml	81-83
<u>Albuminurie</u>	kin. nephelometr. mit Standards & Antikörpern des "Liquorprogramms" ICS Rate-Nephelo- meter, Beckmann München	bis 10 mg/g Crea (Nachweisgrenze: 7 mg/l)	85-87

*)
Berechnung der GFR :

$$\text{GFR} = \frac{\text{Creatinin-Konz. i. Urin (mg/l)}}{\text{Creatinin-Konz. i. Serum (mg/l)}} \times \text{Urinzeit-Vol. (ml/min.)}$$

Urinzeitvolumen für jede Niere. Diese Daten bildeten die Grundlage für die Berechnung der Glomerulären Filtrationsrate GFR (in ml/min.), der fraktionellen Natrium-Reabsorption (in %) und des Harnkonzentrierungsvermögens (ohne Einheit).

Abschließend wurden Nieren von Hunden der 2. Versuchsreihe histologisch unter dem Elektronenmikroskop aufgearbeitet und quantitativ ihr Schädigungsgrad entsprechend dem Histomorphologischen Index (HMF -: %-Satz der maximalen Schädigung) festgestellt. Als Beurteilungskriterien dienten das jeweilige Ausmaß der Zellschwellungen, des Bürstensaumverlusts und der Einzelzellnekrosen in den Abschnitten entlang dem Nephron (proximales Konvolut, S₃-Segment, dicker, aufsteigender Teil der Henle'schen Schleife und distales Konvolut).

5. Statistische Methoden

5.1. Kontrolle der Analyseergebnisse:

Die photometrische Messung der Enzymaktivitäten von NAG und AAP wurde durch tägliches Mitführen von selbsthergestellten Kontrollproben (Doppelwertbestimmungen) überwacht. Es handelte sich um Eluate von Diabetiker- Urinen, deren Aktivitäten für beide Enzyme zwischen 8 und 14 U/l lagen. Während des Studienzeitraums von März 1983 bis April 1984 (13 Monate) wurden 5 verschiedene Kontroll-Eluate verwendet, die bis zur Analyse bei -30°C eingefroren waren. Als Maß für die Genauigkeit des Enzymbestimmungsverfahrens wurde die "Präzision von Tag zu Tag" (Lit.: 129;133) und die "Präzision in der Serie" (Lit.: 134) ermittelt.

"Präzision von Tag zu Tag":

$$\begin{aligned} \text{Variabilitätskonstante} \quad \text{VK (in \%)} &= \frac{s}{\bar{x}} \times 100 = \\ \text{bzw.} & \\ \text{Variationskoeffizient} &= \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \times \frac{100}{\bar{x}} ; \end{aligned}$$

mit n =: Anzahl der an verschiedenen Tagen bestimmten Einzel-Enzymaktivitäten x (1. Wert)
 $\bar{x}$ =: arithmetischer Mittelwert der an verschiedenen Tagen erhobenen Einzelwerte
 und s =: "Standardabweichung von Tag zu Tag"

"Präzision in der Serie":

$$\begin{aligned} \text{Variabilitätskonstante} \quad \text{VK (in \%)} &= \frac{s_S}{\bar{x}} \times 100 = \\ \text{bzw.} & \\ \text{Variationskoeffizient} &= \sqrt{\frac{\sum (x'_i - x''_i)^2}{2m}} \times \frac{100}{\bar{x}} ; \end{aligned}$$

mit m =: Anzahl der Enzym-Doppelwertbestimmungen pro Kontrolleluat
 $(x'_i - x''_i)$ =: Differenz der Doppelwerte pro Enzymaktivitätsmessung/Kontrolleluat
und s_S =: "Standardabweichung in der Serie"

Da die Creatinin- und Albuminbestimmungen im klinisch-chemischen Labor des Krankenhauses München-Schwabing durchgeführt wurden, werden die entsprechenden Präzisionswerte für den Studienzeitraum übernommen. Bei den glycosylierten Serumproteinen stützen sich die Angaben auf die wissenschaftlichen Veröffentlichungen des Labors (Lit.:79).

5.2. Statistische Testverfahren:

In der statistischen Auswertung der Untersuchungsergebnisse kamen der "Wilcoxon-Test für Paardifferenzen" (Vergleich von gepaarten Meßwerten) und der "Wilcoxon-Test für zwei unabhängige Stichproben" zur Anwendung (Lit.: 129;131).

D. Ergebnisse

1. Ergebnisse zur Methodik

1.1. Stabilität der für die Enzymaktivitätsbestimmungen verwendeten Materialien und Reagenzien:

Mit Ausnahme der pulverisierten Enzymsubstrate für NAG und AAP (Firmenbezeichnungen s. Anhang), die bei -30°C eingefroren werden mußten, konnten alle anderen Substanzen und Lösungen, sowie die Sephadex-G-25-M-Fertigsäulen bei $+8^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank gelagert werden.

Die selbsthergestellten Pufferlösungen (0,1 M Citronensäure-Citrat-Puffer, 0,75 M 2-Amino-2-Methyl-1-Propanol-Puffer und 0,5 M Tris-Puffer) waren mindestens 2 Monate, d.h. bis zum Verbrauch, stabil. Dagegen mußten die gepufferten Substratlösungen bei täglichem Gebrauch nach spätestens 8 (AAP) bzw. 14 Tagen (NAG) erneuert werden. Durch Einwirkung von Licht und/oder durch bakterielle Kontaminationen kam es zunehmend zur Bildung von p-Nitrophenolat bzw. p-Nitroanilid und damit Gelbfärbung der Lösungen. Dies machte sich durch eine Erhöhung der Leerwerte bemerkbar. Zur Verbesserung ihrer Haltbarkeit empfahl sich daher die Aufbewahrung der Substratlösungen in dunklen Gläsern, sowie deren gründli-

che Spülung bei Neuansatz der Lösungen und die Kühlung der Gefäße während des Procederes der Enzymbestimmung.

Die Sephadex-G-25-M-Fertigsäulen mußten ersetzt werden, sobald die Urochrome, auch durch mehrmaliges Spülen mit physiologischer NaCl-Lösung, nicht mehr ausgewaschen werden konnten.

1.2. Präzisionen der angewandten Bestimmungsverfahren für die Enzymaktivitäten von NAG und AAP und die Konzentrationen von Creatinin, Albumin und denen der glycosylierten Serumproteine:

Das Ergebnis der Präzision bei den Untersuchungen der Harnenzymaktivitäten von NAG und AAP während der Monate März 1983 bis April 1984 findet sich in nebenstehenden Tabellen Nr. 5 und 6. Für den entsprechenden Zeitraum ermittelte das klinisch-chemische Labor des Krankenhauses München-Schwabing im Rahmen seiner Messungen der Creatinin- und Albuminkonzentrationen im Urin "Präzisionswerte von Tag zu Tag" zwischen 2,23 und 3,88 (Creatinin) bzw. 6,26 und 6,90 % (Albumin). Die vom Forschungslabor Schleicher/Wieland veröffentlichten Variationskoeffizienten bei der Bestimmung der glycosylierten Serumproteine betrugen 2,9 (Präzision in der Serie) und 8,4 % (Präzision von Tag zu Tag) (Lit.: 79).

Übersicht: Kontrolle der Enzymbestimmungsverfahren von
NAG und AAP

A. "Präzision von Tag zu Tag":

<u>Anzahl der</u> <u>Messungen</u>	<u>Mittelwert</u>	<u>Präzision</u> <u>v. Tag zu Tag</u>
n	$\bar{x}$ (U/l)	VK in %

NAG:

Eluat 1	19	12,60	10,03
Eluat 2	15	12,11	11,14
Eluat 3	19	13,28	14,01
Eluat 4	21	8,92	4,14
Eluat 5	15	9,38	4,89

AAP:

Eluat 1	19	12,51	14,41
Eluat 2	14	9,70	11,87
Eluat 3	18	13,95	8,31
Eluat 4	21	8,15	6,57
Eluat 5	14	9,15	12,90

B. "Präzision in der Serie":

<u>Anzahl der</u> <u>Messungen</u>	<u>Mittelwert</u>	<u>Präzision</u> <u>in der Serie</u>
m	$\bar{x}$ (U/1)	Vk in %

NAG:

Eluat 1	11	12,60	2,12
Eluat 2	8	12,11	3,17
Eluat 3	17	13,28	3,63
Eluat 4	20	8,92	1,09
Eluat 5	15	9,38	1,55

AAP:

Eluat 1	10	12,51	1,95
Eluat 2	9	9,70	2,39
Eluat 3	16	13,95	3,19
Eluat 4	11	8,15	2,81
Eluat 5	5	9,15	1,91

Tab. 6

2. Ergebnisse zur Diabetiker-Studie

2.1. Langzeitstudie mit Typ-I-Diabetikern:

2.1.1. Enzym- und Albuminurie bei Typ-I-Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung und bei gesunden Kontrollpersonen:

Aus den Teilnehmern der Diabetiker-Studie wurden 11 Patienten mit einer Erkrankungsdauer unter 1 Jahr, guter Stoffwechseleinstellung (Glucos- und Ketonurie negativ, glycosyliertes Hämoglobin Hb A₁ und glycosylierte Serumproteine GSP im Normbereich), ohne Einschränkung der Nierenfunktion (Glomeruläre Filtrationsrate GFR zwischen 70 und 120 ml/min.) und ohne Hinweise für das Vorliegen einer diabetischen Retinopathie (Beurteilungskriterien s. Tab. 2) ausgewählt und die Ausscheidung von NAG, AAP und Albumin im Urin mit der von 5 gesunden Personen verglichen. Für alle drei Parameter waren bei den Diabetikern die Wahrscheinlichkeiten für Werte über dem in der Literatur (12,85-87) angegebenen physiologischen Bereich (NAG 2-10 U/g Crea., AAP 2-6 U/g Crea., Albumin unter 10 U/g Crea.) deutlich höher. Sie betrugen für NAG 9 % (versus 0 %), für Albumin 18,2 % (versus 0 %) und für AAP 54,5 % (versus 20 %). Bei der NAG war der Enzymaktivitätsunterschied statistisch auffällig ($p \leq 0,05$) (s. Tab. 7).

Vergleich: Enzymurie von NAG und AAP und Albuminausscheidung
im Harn bei Typ-I-Diabetikern mit guter Stoffwech-
seleinstellung und bei gesunden Kontrollpersonen

Normalpersonen

Diabetiker

Signifikanz-
Niveau

n = 5

n = 11

<u>NAG:</u>			
U/g Crea.	3,32 ± 0,77	6,86 ± 4,35	p ≤ 0,05
Bereich:	2,67 bis 4,61	2,47 bis 18,08	
<u>AAP:</u>			
U/g Crea.	4,00 ± 2,39	6,51 ± 5,22	n.s.
Bereich:	0,44 bis 7,13	0,74 bis 16,97	
<u>Albumin:</u>			
U/g Crea.	5,19 ± 2,19	13,10 ± 17,00	n.s.
Bereich:	3,06 bis 7,82	2,86 bis 62,25	

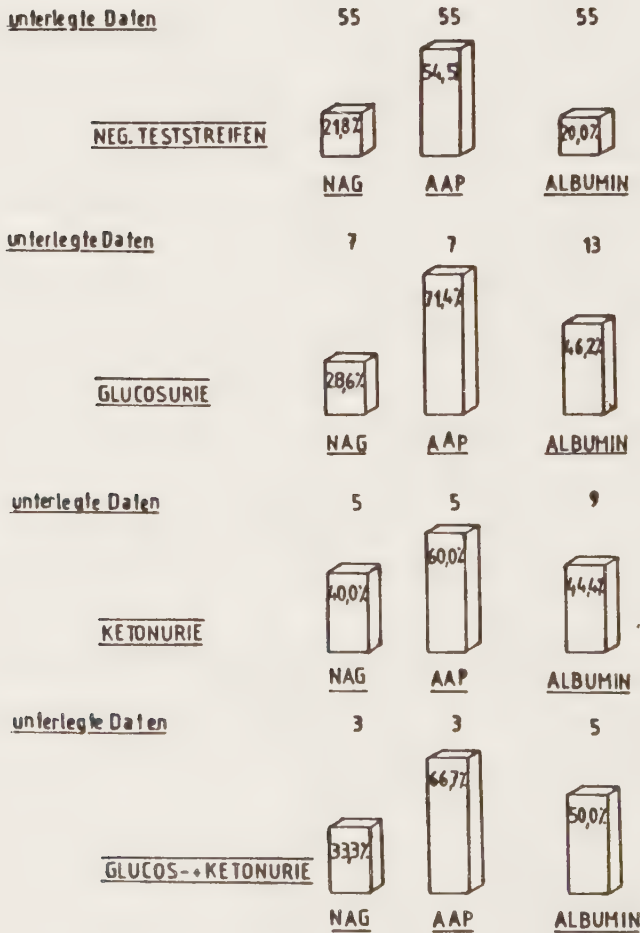
2.1.2. Enzym- und Albuminurie in Abhängigkeit von der Stoffwechseleinstellung und von der Diabetesdauer:

Die Qualität der Stoffwechseleinstellung der untersuchten Typ-I-Diabetiker wurde einerseits nach dem Ausmaß der Glucosurie und Ketonurie (aktueller Stand), andererseits nach dem Anteil des glycosylierten Hämoglobins (Hb A_1), bzw. der Konzentration der glycosylierten Serumproteine (GSP) im Blut (Grad der Stoffwechselstabilität) beurteilt. Es bestanden keine Korrelationen der gemessenen Enzym- und Albuminurien zu den absoluten Werten dieser Parameter.

Das alleinige Vorliegen einer passageren Glucosurie (Hb A_1 , GSP im Normbereich) bewirkte zunächst eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeiten für pathologische AAP- und Albuminurien von 54,5 auf 71,4 % bzw. von 20,0 auf 46,2 %. Bei hinzukommender Ketonurie nahm auch der Prozentsatz erhöhter NAG-Aktivitäten im Urin zu (Einzelheiten s. Abb. 4).

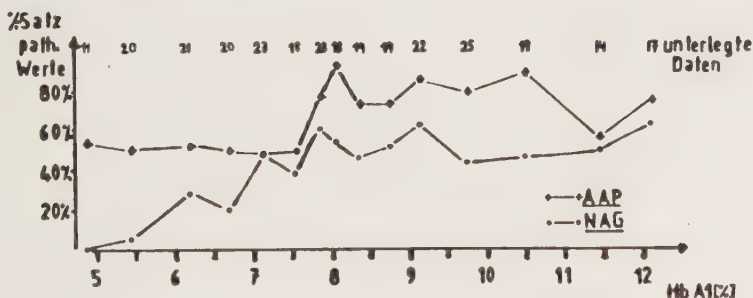
Parallel mit dem Glycosylierungsanteil des Hämoglobins (Hb A_1) und der Serumproteine (GSP) im Blut verliefen die Ausscheidungskurven von NAG, AAP und Albumin (s. Abb. 5 und 6). Dabei wurde deutlich, daß die Zunahmen pathologischer Enzym- und Albuminurien eng mit der Überschreitung physiologischer Hb A_1 - und GSP-Werte (8 % bzw. 6,5 nmol/mg Protein) verknüpft waren. Mit einem sprunghaften Anstieg erhöhter Urinaktivitäten von

ENZYM - und ALBUMINURIE bei GLUCOSURIE, KETONURIE und GLUCOS - + KETONURIE

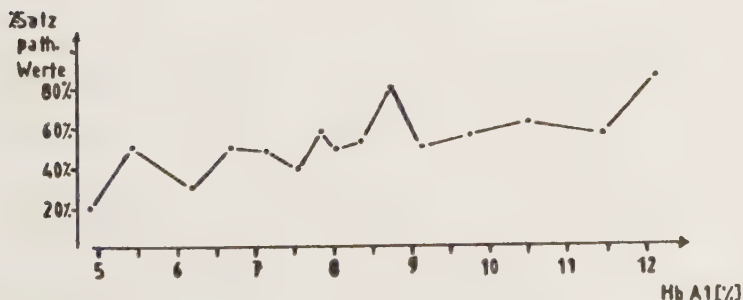


ENZYM – und ALBUMINURIE in ABHÄNGIGKEIT vom GLYCOSYLIERTEN HÄMOGLOBIN Hb A₁

NAG und AAP

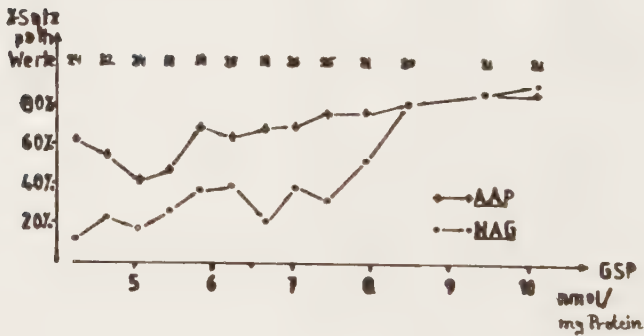


ALBUMIN



ENZYM — und ALBUMINURIE in ABHÄNGIGKEIT von den GLYCOSYLIERTEN SERUMPROTEINEN GSP

NAG und AAP



ALBUMIN

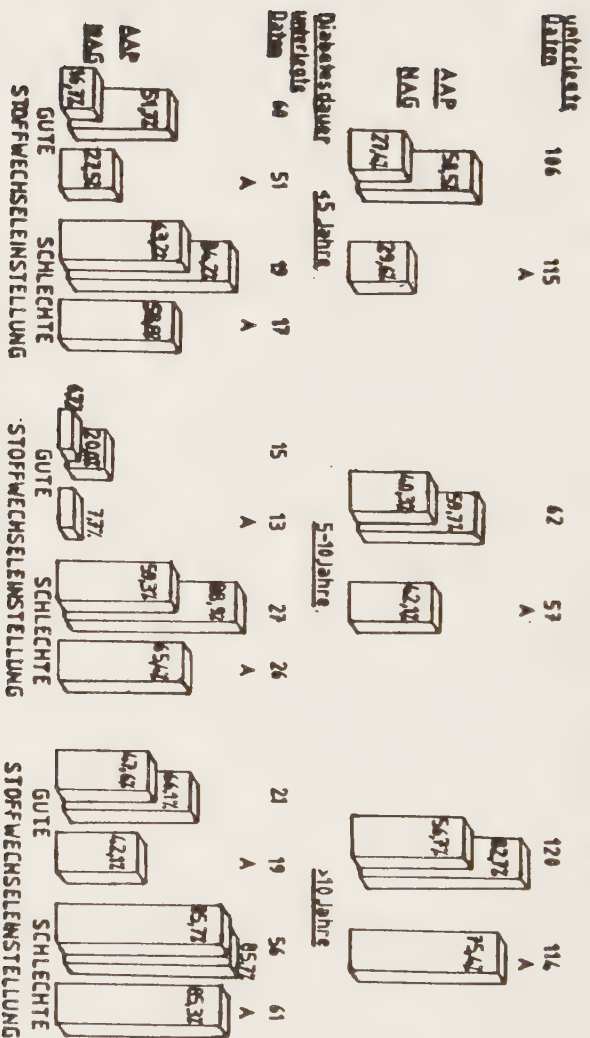


30 auf 80 % im Bereich zwischen 7,5 und 8,5 nmol GSP/mg Protein war diese Tendenz bei der NAG am stärksten ausgeprägt.

Innerhalb der ersten 10 Jahre nach Manifestation des Diabetes mellitus waren die Enzym- und Albuminurien besonders von der Qualität der Stoffwechseleinstellung abhängig. Eine Verschlechterung der Lang- und Kurzzeitparameter (HbA_1 und GSP pathologisch bei positiver Glucos- und/oder Ketonurie versus HbA_1 und GSP im Normbereich bei negativem Glucos- und Ketonurie-Nachweis) erbrachte einen deutlichen Anstieg der Wahrscheinlichkeiten für pathologische Werte (s. Abb. 7). Signifikant höhere Harnausscheidungen zu Beginn der Erkrankung (Diabetesdauer unter 5 Jahre) wurden allerdings nur für die NAG gemessen ($p \leq 0,001$). Im Zeitraum zwischen 5 und 10 Jahren nach Manifestation diskriminierten alle drei Parameter signifikant zwischen guter und schlechter Stoffwechseleinstellung (jeweils: $p \leq 0,001$) (s. Abb. 8 und Tab. 8;9).

Nach über 10 Jahren ergaben sich zunehmend höhere Enzym- und Albuminurien. Eine Abhängigkeit von der Diabetesdauer zeigte sich insbesondere bei Vergleich der Werte aus den Phasen '5-10' bzw. 'über 10 Jahre' nach Diagnosestellung, jeweils bei gut reguliertem Stoffwechsel. Im letztgenannten Stadium führten Stoffwechselentgleisungen lediglich zu signifikant höheren Albuminurien ($p \leq 0,001$) (s. Abb. 8 und Tab. 10;11).

ENZYM- und ALBUMINURIE bei TYP-1-DIABETIKERN in ABHÄNGIGKEIT von DIABETESDAUER und STOFFWECHSELEINSTELLUNG



ENZYM – und ALBUMINURIE bei TYP-I-DIABETIKERN in ABHÄNGIGKEIT v. DIABETESDAUER u. STOFFWECHSELEINSTELLUNG

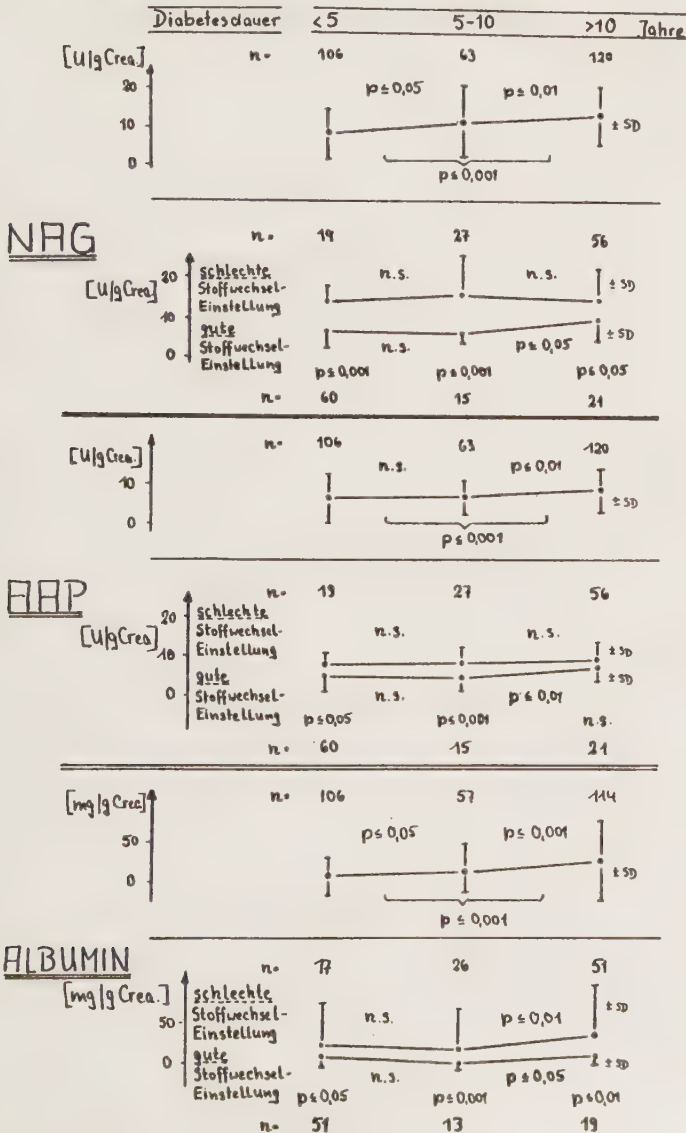


Abb. 8

Vergleich: Enzymurie von NAG und AAP und Albuminausscheidung
im Harn bei Typ-I-Diabetikern in Abhängigkeit von
Stoffwechseleinstellung und Diabetesdauer

Diabetesdauer unter 5 Jahre:

<u>Einstellung der Stoffwechsellaage</u>	<u>Signifikanz-</u>
<u>gut</u>	<u>Niveau</u>
<u>schlecht</u>	
n = 60	n = 19

<u>NAG:</u>			
U/g Crea.	6,66 ± 4,67	12,33 ± 5,74	p ≤ 0,001
Bereich:	1,83 bis 22,33	4,76 bis 25,60	
<u>AAP:</u>			
U/g Crea.	5,62 ± 4,55	7,82 ± 2,63	p ≤ 0,05
Bereich:	0,24 bis 20,43	2,94 bis 13,59	

	n = 51	n = 17	
<u>Albumin:</u>			
mg/g Crea.	16,33 ± 28,88	42,59 ± 113,1	p ≤ 0,05
Bereich:	2,86 bis 180,7	2,64 bis 480,0	

Diabetesdauer 5 - 10 Jahre:

Einstellung der Stoffwechsellage Signifikanz-
gut schlecht Niveau

n = 15

n = 27

<u>NAG:</u>			
U/g Crea.	5,98 ± 2,56	15,55 ± 10,58	p ≤ 0,001
Bereich:	2,67 bis 12,65	0,10 bis 45,30	
<u>AAP:</u>			
U/g Crea.	3,92 ± 2,46	8,58 ± 3,87	p ≤ 0,001
Bereich:	0,13 bis 8,40	0,86 bis 21,61	

	n = 13	n = 26	
<u>Albumin:</u>			
mg/g Crea.	7,04 ± 6,12	36,60 ± 104,3	p ≤ 0,001
Bereich:	2,88 bis 26,07	4,62 bis 545,0	

Diabetesdauer über 10 Jahre:

Einstellung der Stoffwechsellaage Signifikanz-

gut

schlecht

Niveau

n = 21

n = 56

<u>NAG:</u>			
U/g Crea.	9,34 ± 4,93	14,74 ± 7,40	p ≤ 0,05
Bereich:	1,76 bis 20,16	1,82 bis 37,20	
<u>AAP:</u>			
U/g Crea.	7,49 ± 4,07	9,21 ± 4,98	n.s.
Bereich:	0,35 bis 13,15	0,64 bis 22,54	

	n = 19	n = 51	
<u>Albumin:</u>			
mg/g Crea.	13,62 ± 12,59	73,48 ± 129,7	p ≤ 0,01
Bereich:	1,02 bis 43,89	5,04 bis 859,0	

bei guter Stoffwechseleinstellung:

<u>Diabetesdauer:</u>	5 - 10	über 10	<u>Signifikanz-</u>
(Jahre)			<u>Niveau</u>
	n = 15	n = 21	

<u>NAG:</u>			
U/g Crea.	5,98 ± 2,56	9,34 ± 4,93	p ≤ 0,05
Bereich:	2,67 bis 12,65	1,76 bis 20,16	
<u>AAP:</u>			
U/g Crea.	3,92 ± 2,46	7,49 ± 4,07	p ≤ 0,01
Bereich:	0,13 bis 8,40	0,35 bis 13,15	

	n = 13	n = 19	
<u>Albumin:</u>			
mg/g Crea.	7,04 ± 6,12	13,62 ± 12,59	p ≤ 0,05
Bereich:	2,88 bis 26,07	1,02 bis 43,89	

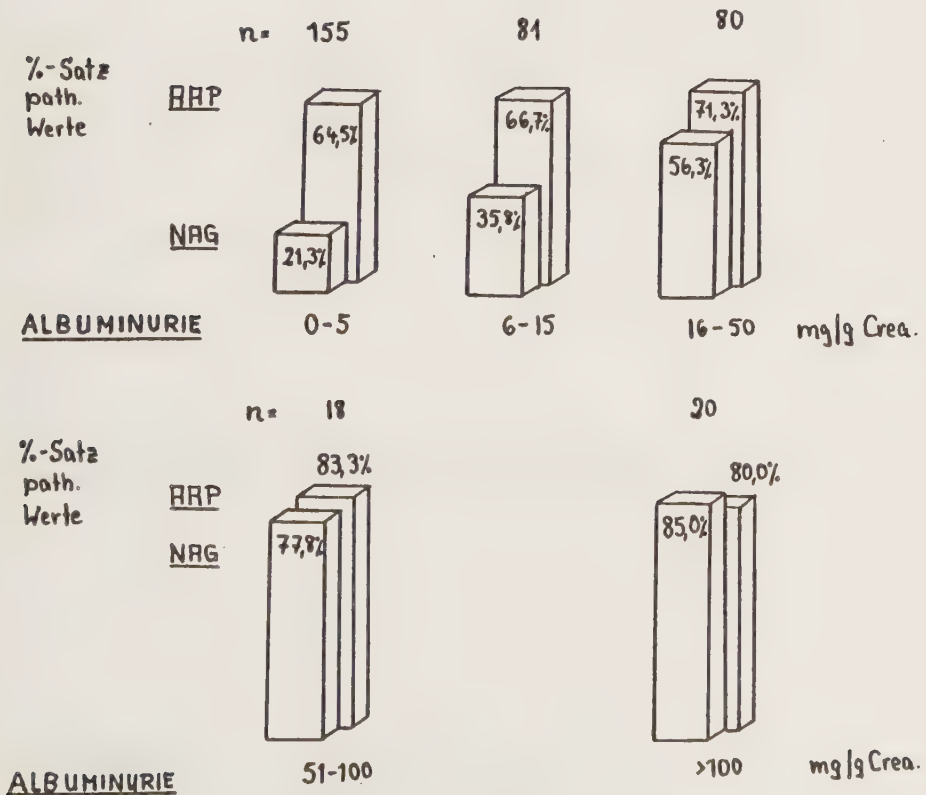
2.1.3. Enzymurie in Abhängigkeit von Albuminurie, Glomerulärer Filtrationsrate GFR und Anzeichen einer beginnenden Nephropathie:

Aus der Abb. 9 geht hervor, daß eine Beziehung zwischen pathologischen Albumin- (Werte über 10 mg/g Crea.) und Enzymurien von NAG und AAP besteht. Ausgehend von Albuminausscheidungen zwischen 9 und 10 mg/g Crea. nahmen die Wahrscheinlichkeiten für erhöhte Harnaktivitäten von 24,0 (NAG) bzw. 56,0 % (AAP) kontinuierlich zu und erreichten im Bereich von 51 bis 100 mg/g Crea. 77,8 bzw. 83,3 %. Die absoluten, auf das Harncreatinin bezogenen Albuminkonzentrationen korrelierten jedoch nicht zu den entsprechenden Enzymaktivitäten im Urin.

Die Beurteilung der Enzymurien in Abhängigkeit von der Glomerulären Filtrationsrate GFR (Creatininclearance) ergab nur für die NAG einen charakteristischen Zusammenhang: Mit zunehmender GFR sank die Wahrscheinlichkeit erhöhter Enzymausscheidungen (s. Abb. 10).

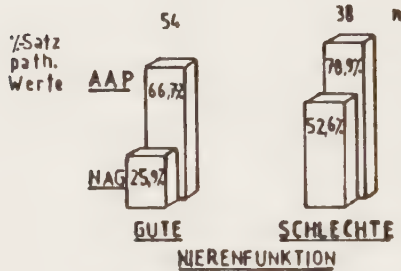
Hinweise für das Vorliegen beginnender nephropathischer Veränderungen (GFR < 90 ml/min. verbunden mit einer Albuminurie über 10 mg/g Crea., ohne Erhöhung der Serum-Creatininkonzentration) korrelierten insbesondere zu einer Zunahme pathologischer NAG-Aktivitäten im Urin ($p \leq 0,001$; s. Tab. 12).

ENZYMURIE in ABHÄNGIGKEIT von der ALBUMINAUSSCHEIDUNG im URIN



ENZYMURIE bei TYP-I-DIABETIKERN in ABHÄNGIGKEIT von

NIERENFUNKTION



GLOMERULÄRER FILTRATIONSRATE

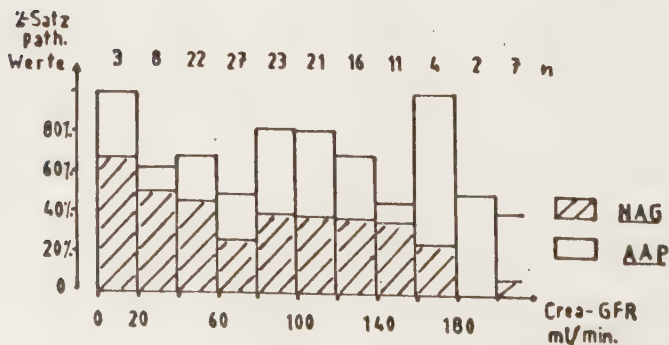


Abb. 10

Vergleich: Enzymurie von NAG und AAP bei Typ-I-Diabetikern
in Abhängigkeit von der Nierenfunktion

<u>gute</u>	<u>schlechte</u>	<u>Signifikanz-</u>
<u>Nierenfunktion</u>	<u>Nierenfunktion</u>	<u>Niveau</u>
n = 54	n = 38	

<u>NAG:</u>			
U/g Crea.	7,71 ± 4,54	13,26 ± 7,03	p ≤ 0,001
Bereich:	0,10 bis 19,97	1,76 bis 29,48	
<u>AAP:</u>			
U/g Crea.	6,36 ± 3,54	9,00 ± 5,24	p ≤ 0,05
Bereich:	0,23 bis 13,79	0,79 bis 22,54	

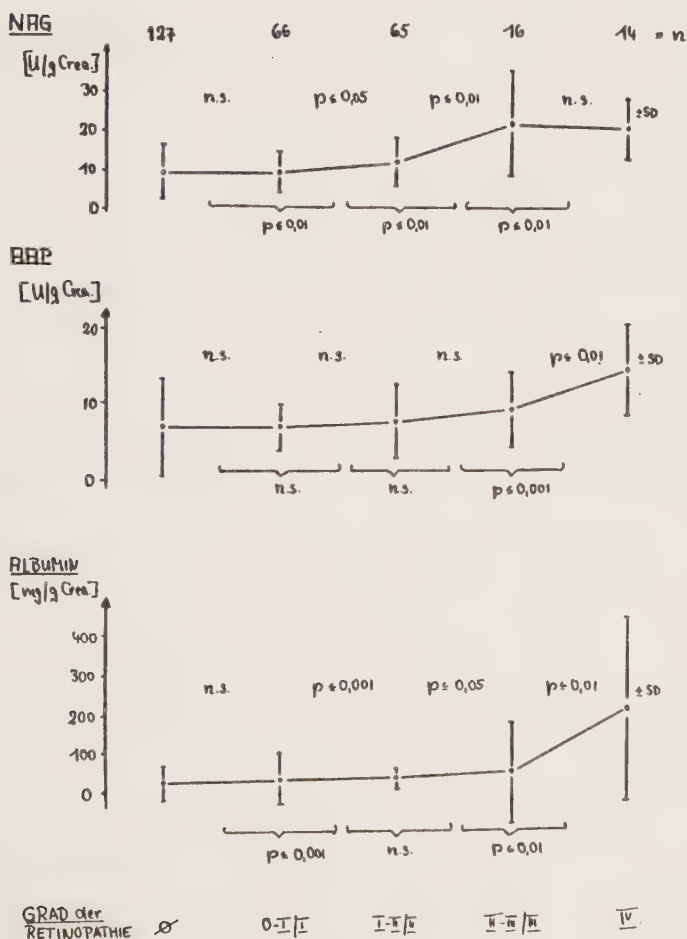
2.1.4. Enzym- und Albuminurie in Abhängigkeit vom Grad der diabetischen Retinopathie:

Im Verlauf der Studie wurden alle teilnehmenden Patienten augenärztlich untersucht. Die zugrunde gelegte Klassifikation des Befundes in Schweregrade findet sich in Tab. 2.

Mit Verschlechterung des Gefäßzustandes am Augenhintergrund nahmen die Wahrscheinlichkeiten erhöhter Enzym- und Albuminurien kontinuierlich zu. Bei NAG und Albumin bewegten sich die Werte von 38,1 bzw. 39,4 (Retinopathie 0-I/I) bis 85,7 bzw. 92,9 % (Retinopathie IV). Für die AAP war die Spannbreite der Prozentsätze mit 74,6 und 92,9 % deutlich geringer.

Zu einem signifikanten Anstieg der Albuminurie kam es am Übergang von der Retinopathie 0-I/I zu I-II/II ($p \leq 0,001$) und von II-III/IV ($p \leq 0,01$). Signifikante Aktivitätserhöhungen der NAG im Urin waren bei Vergleich der Werte von Retinopathie I-II/II und II-III/III zu verzeichnen ($p \leq 0,01$). Bei der AAP bestand ein signifikanter Unterschied zwischen Retinopathie II-III/III und IV ($p \leq 0,01$) (s. Abb. 11 und Tab. 13;14).

ENZYM- und ALBUMINURIE bei TYP-I-DIABETIKERN in ABHÄNGIGKEIT vom GRAD der RETINOPATHIE



Vergleich: Enzymurie von NAG und AAP und Albuminausscheidung
im Harn bei Typ-I-Diabetikern in Abhängigkeit vom
Grad der diabetischen Retinopathie

<u>Grad der</u>			<u>Signifikanz-</u>
<u>Retinopathie:</u>	0-I/I	I-II/II	<u>Niveau</u>
	n = 66	n = 65	

<u>NAG:</u>			
U/g Crea.	9,33 ± 7,05	11,65 ± 6,28	p ≤ 0,05
Bereich:	1,76 bis 24,16	0,10 bis 31,50	
<u>Albumin:</u>			
mg/g Crea.	32,30 ± 64,41	34,30 ± 26,04	p ≤ 0,001
Bereich:	2,88 bis 295,5	2,88 bis 114,7	

<u>Grad der</u>			<u>Signifikanz-</u>
<u>Retinopathie:</u>	I-II/II	II-III/III	<u>Niveau</u>
	n = 65	n = 16	

<u>NAG:</u>			
U/g Crea.	11,65 ± 6,28	21,53 ± 13,41	p ≤ 0,01
Bereich:	0,10 bis 31,50	3,26 bis 45,30	
<u>Albumin:</u>			
mg/g Crea.	34,30 ± 26,04	49,50 ± 132,9	p ≤ 0,05
Bereich:	2,88 bis 114,7	4,36 bis 545,0	

Grad der Retinopathie: II-III/III III-IV/IV Signifikanz-
Niveau

n = 16

n = 14

<u>AAP:</u>			
U/g Crea.	8,62 ± 4,92	13,86 ± 5,85	p ≤ 0,01
Bereich:	0,63 bis 21,61	2,73 bis 26,54	
<u>Albumin:</u>			
mg/g Crea.	49,50 ± 132,9	206,7 ± 234,8	p ≤ 0,01
Bereich:	4,36 bis 545,0	1,02 bis 859,0	

Grad der Retinopathie: I-II/II III-IV/IV Signifikanz-
Niveau

n = 65

n = 14

<u>NAG:</u>			
U/g Crea.	11,65 ± 6,28	20,05 ± 7,75	p ≤ 0,01
Bereich:	0,10 bis 31,50	2,98 bis 27,90	

2.2. Akute Stoffwechselentgleisung bei Typ-II-Diabetikern:

2.2.1. Patientin B., Ch., 69 Jahre:

Bei der stationären Aufnahme der Patientin B., Ch., deren Stoffwechsel nach einem grippalen Infekt entgleist war, lag die post-prandiale Blutzuckerkonzentration bei 444 mg/dl. Auch die Harnzuckerwerte im 24-h-Urin waren erhöht (3,6 g/dl). Nach einem allmählichen Rückgang des Blutzuckerspiegels auf post-prandiale Werte unter 200 mg/dl (Verordnung einer Kalorien-reduzierten Kost und Einnahme von Euglucon-N-Tabletten), kam es am 4. stationären Tag zu einem erneuten Blutzuckeranstieg auf 263 mg/dl. Daraufhin wurde die medikamentöse Therapie durch Applikation von Depot-Insulin (Depot-Insulin-S-Hoechst) erweitert.

Einen Tag vor diesem Ereignis wurde mit Enzym- und Albuminbestimmungen im Urin begonnen (s. Abb. 12). Dabei zeigte sich, daß die plötzliche Zunahme der Blutzuckerkonzentration von Anstiegen der Enzymurien begleitet wurde. Im Gegensatz zur NAG, deren Ausscheidung auch im weiteren Verlauf im Normalbereich blieb, waren die AAP-Aktivitäten im Urin am 2. folgenden Tag mäßig erhöht (8,02 bis 7,33 U/g Crea.). Danach wurden keine pathologischen Werte mehr gemessen.

Die Albuminkonzentration zeigte einen Tag nach Erholung der Hyperenzymurie von AAP einen Ausscheidungs-

AKUTE STOFFWECHSELENTGLEISUNG bei TYP-II-DIABETIKERN

B.,CH.:

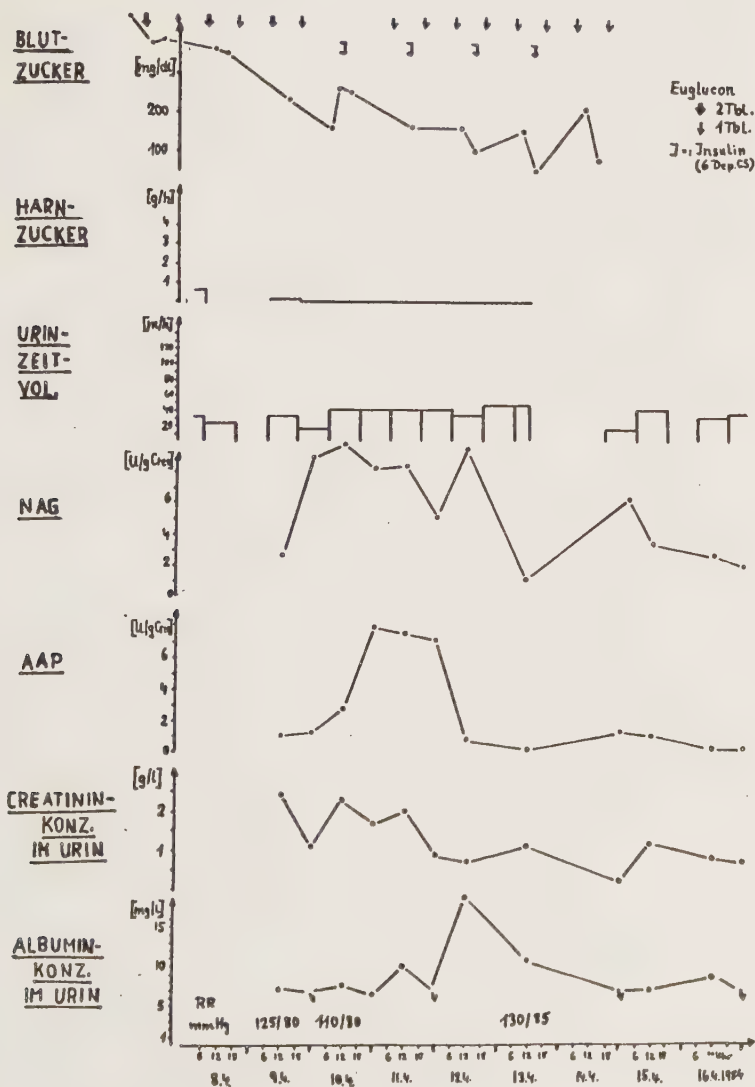


Abb. 12

gipfel mit 27,9 mg/g Crea. Während des übrigen Untersuchungszeitraums lag sie unter 10 mg/g Crea.

2.2.2. Patient Sch., H., 48 Jahre:

Als der Patient Sch., H. mit Anzeichen einer dekompensierten, diabetischen Stoffwechsellage in die Klinik aufgenommen wurde, fanden sich neben erhöhten postprandialen Blutzuckerkonzentrationen (über 330 mg/dl) auch pathologische Zucker- und Albumin-, sowie NAG- und AAP-Ausscheidungen im Urin. Zeitlich fiel diese "Blutzuckerspitze" mit den höchsten Harnzucker- (6g/100ml u. h), Albumin- (14,2 mg/g Crea.) und NAG-Urien (49,72 U/g Crea.) zusammen, die während des stationären Aufenthalts gemessen wurden. Die Creatininkonzentration lag zu diesem Zeitpunkt bei 0,5 g/l.

Die einsetzende Therapie mit Kalorien-reduzierter Diät und Euglucon-N-Tabletten führte innerhalb von 10 Tagen zu einer Stabilisierung der Stoffwechsellage mit Normalisierung der Blut- und Harnzuckerkonzentrationen. Parallel kam es zu einem Rückgang der Enzym- und Albuminurien. Dabei fiel auf, daß die NAG- und Albuminausscheidung schon am 2. Tag nach Therapiebeginn den Normalbereich erreichten, während die AAP-Aktivität zunächst noch anstieg (bis 21,72 U/g Crea.), ehe sie endgültig zurückging (s. Abb. 13).

AKUTE STOFFWECHSELENTGLEISUNG bei TYP-II-DIABETIKERN

SCH., H.:

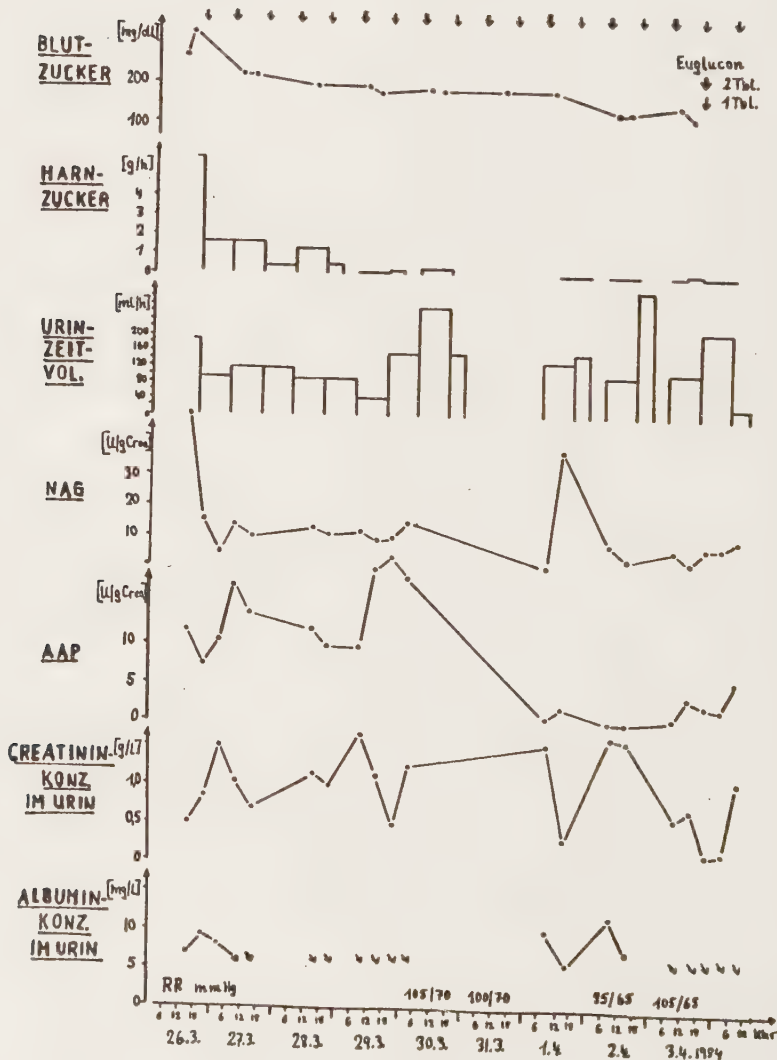


Abb. 13

3. Ergebnisse zum experimentellen akuten Nierenversagen an Hunden

3.1. Adeninnucleotid-Infusion bei uni-nephrektomierten Tieren:

An wachen Hunden wurde 3 Wochen nach rechtsseitiger Nephrektomie die Blutversorgung der verbliebenen linken Niere für 90 min. unterbrochen. Um den Einfluß einer Erhöhung der Gewebskonzentration von energiereichen Phosphatverbindungen auf die Erholung der Nierenfunktion zu überprüfen, erhielten unmittelbar nach Freigabe der Zirkulation 6 Tiere ATP-MgCl₂ - und jeweils 5 Tiere Adenosin- bzw. - zur Kontrolle - physiologische NaCl-Lösungen infundiert (Lit.: 114-118).

Innerhalb dieser Gruppen fielen bei der Überwachung der Nierenfunktionsparameter und der Harnenzyme NAG und AAP über 7 Tage große interindividuelle Unterschiede auf. Wegen der geringen Fallzahlen sollen daher nur Verläufe und Tendenzen herausgestellt werden. In den Abbildungen (Nr. 16-19) sind für die jeweiligen Untersuchungsgrößen die 'Streuungsbreite' (Maxima bzw. Minima - dünne Linien) und der Median (dicke Linie) eingetragen. Davon ausgenommen sind die Kontroll-Tiere (Behandlung mit physiologischer NaCl-Lösung), von denen nur 2 überlebten und als Einzelfälle dargestellt wurden (Abb. 14 und 15). Die anderen 3 Hunde verstarben vor Ende des Be-

EXPERIMENTELLES AKUTES NIERENVERSAGEN an HUNDEN

uni-nephrektomierte Tiere:

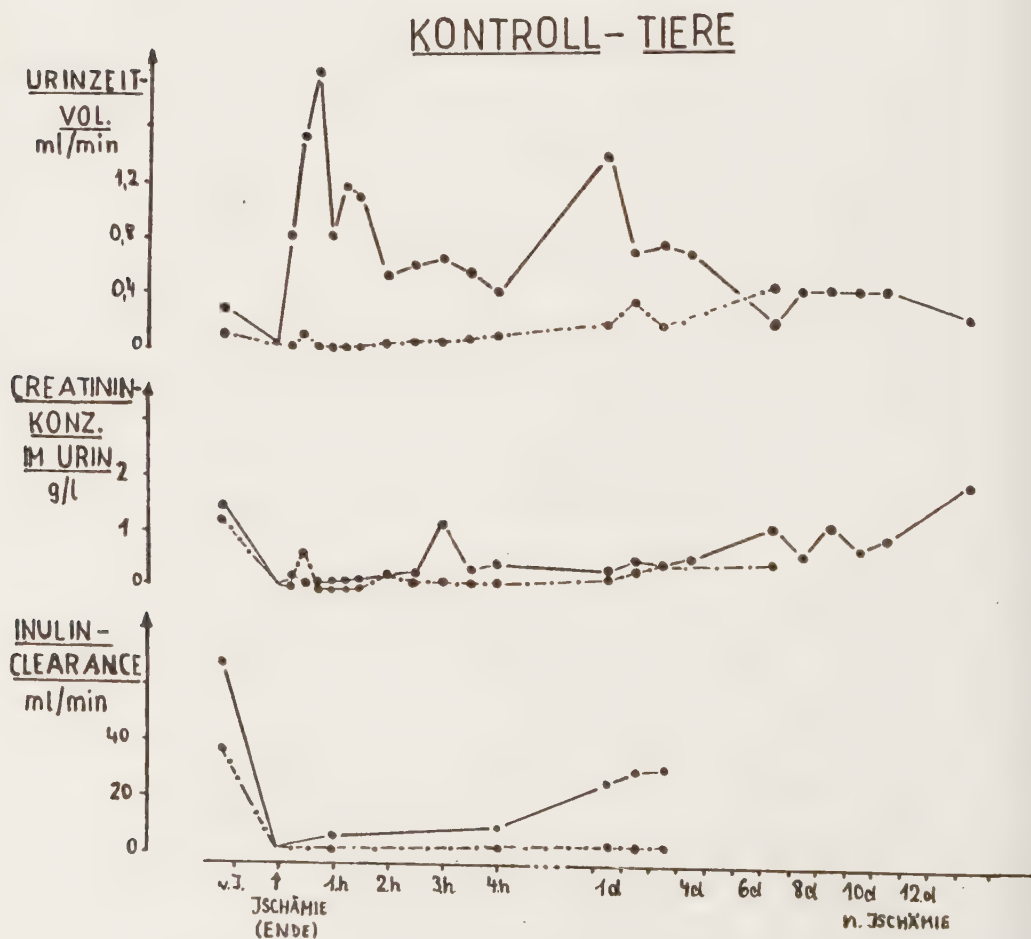
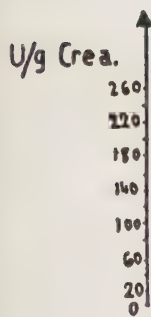
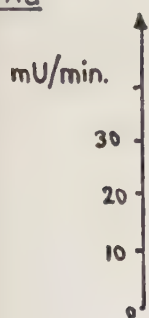
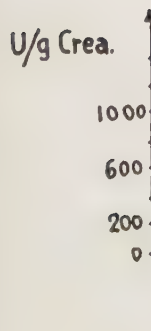
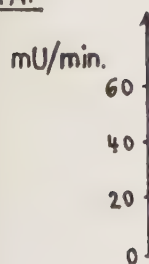


Abb. 14

NAG



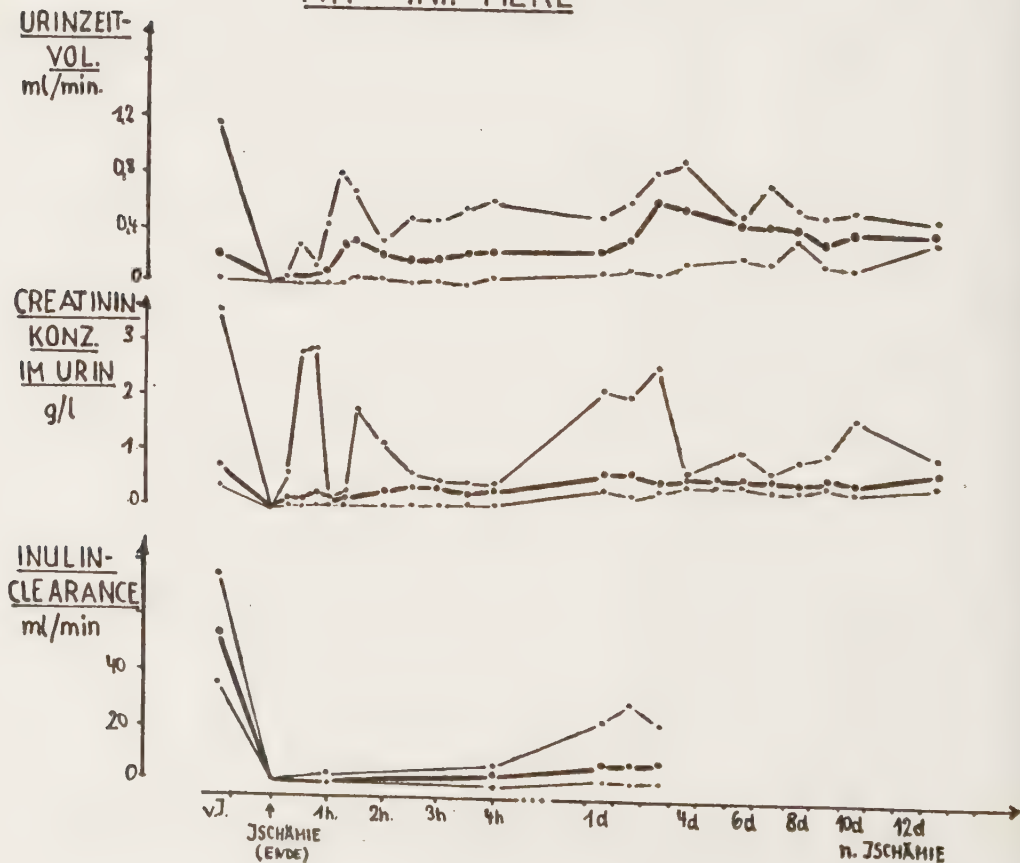
AAP



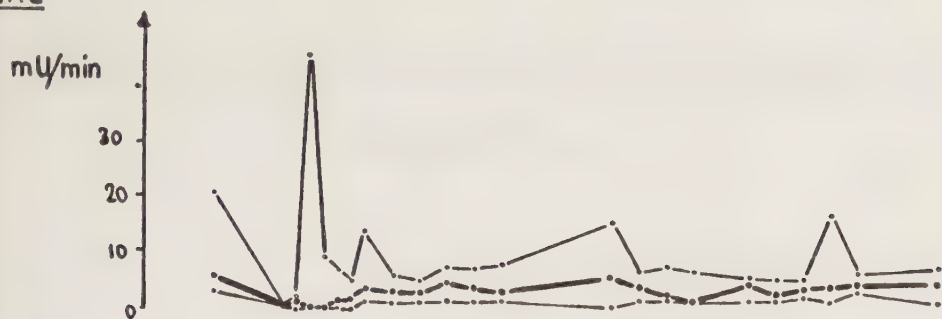
EXPERIMENTELLES AKUTES NIERENVERSAGEN an HUNDEN

uni-nephrektomierte Tiere:

ATP - INF. TIERE



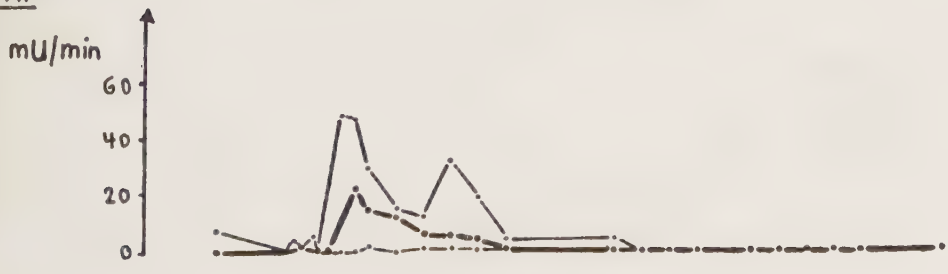
NAG



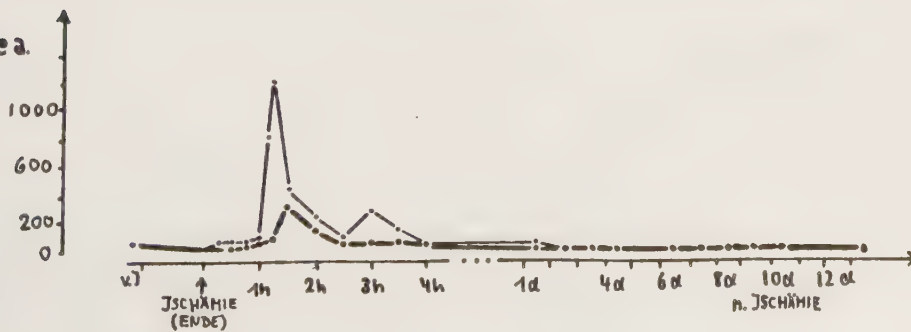
U/gCrea.



AAP



U/gCrea.



EXPERIMENTELLES AKUTES NIERENVERSAGEN an HUNDEN

uni-nephrektomierte Tiere:

ADENOSIN-INF. TIERE

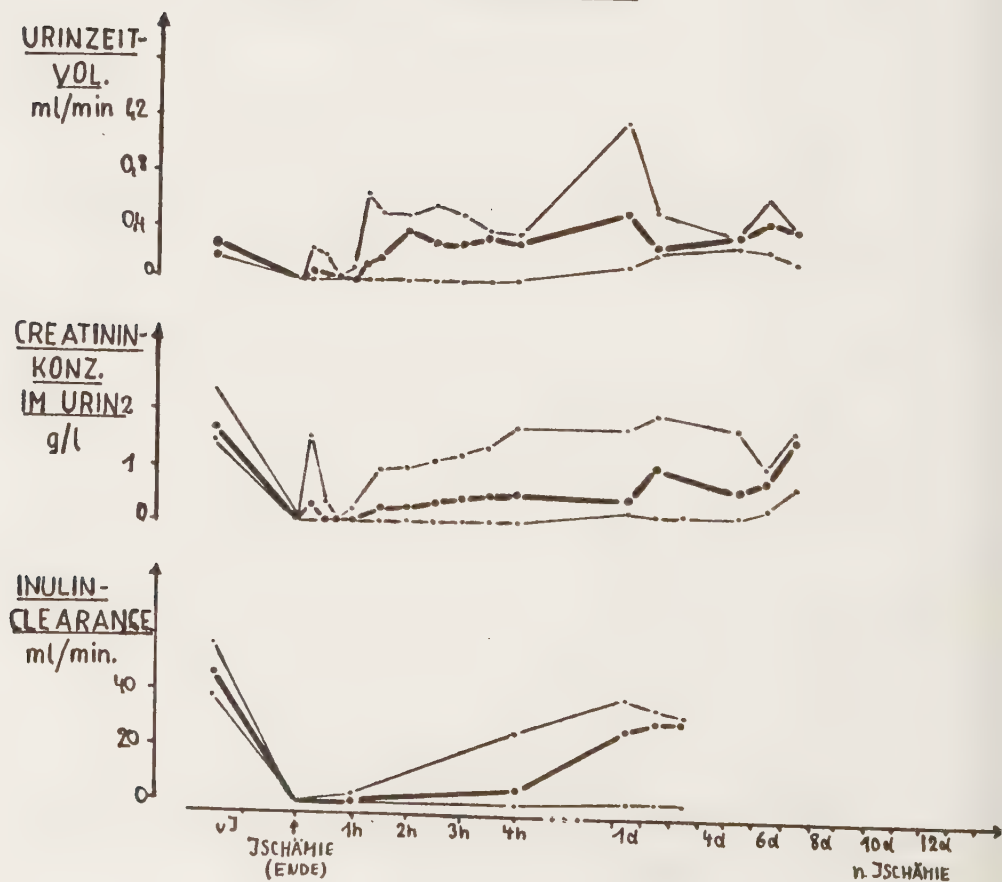
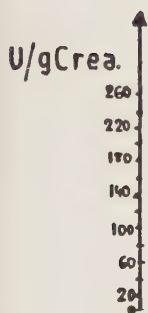
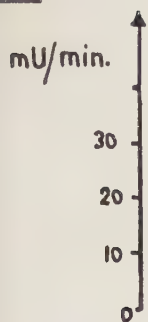
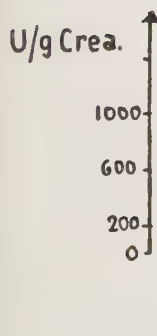
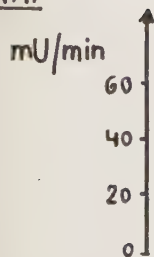


Abb. 18

NAG



AAP



obachtungszeitraums an den Folgen der Urämie.

3.1.1. Verhalten von Glomerulärer Filtrationsrate GFR (Inulin-Clearance), Urinzeitvolumen und Creatininkonzentration im Urin nach Aufhebung der Ischämie:

Mit wieder einsetzender Durchblutung der Niere nach 90-minütiger Ischämie kam es bei allen Überlebenden Tieren zu einer allmählichen Zunahme der Glomerulären Filtrationsrate GFR (Inulin-Clearance), des Urinzeitvolumens und der Creatininkonzentration im Urin (Abb. 14;16; 18): Ein deutlicher Anstieg der Inulin-Clearance erfolgte etwa 4 h nach Beendigung der Ischämie. Bis zum 3. postischämischen Tag (letzte Bestimmung) war bei keinem der Versuchstiere der Ausgangswert vor Ischämie erreicht

Innerhalb der ersten 3 post-ischämischen Stunden zeigte das produzierte Urinzeitvolumen bei 11 von 16 Tieren (4 Kontroll-, 4 ATP- und 3 Adenosin-infundierten Tieren) vorübergehend einen leichten Gipfel und fiel dann wieder ab. Im weiteren Verlauf war ein kontinuierlicher Anstieg der Urinausscheidung zu verzeichnen. Am 7. post-ischämischen Tag lagen die Werte im Mittel geringfügig über denen vor Ischämie.

Auch die Harnkonzentration des Creatinins stieg post-ischämisch kontinuierlich an. Die niedrigsten Werte wurden innerhalb der ersten 90 min. gemessen. Sie

lagen bei den 11 untersuchten Hunden zwischen 0 (Anurie) und 1,7 g/l (Median 0 g/l). Nur bei einem der Tiere (Adenosin-Infusion) stabilisierten sich die Werte, mit 1,5 bis 1,7 g/l bei Harnvolumina zwischen 0,25 und 0,35 ml/min., ab dem 3. Tag im Bereich des Ausgangsniveaus vor Ischämie.

3.1.2. Verhalten der Enzymurien von NAG und AAP nach Aufhebung der Ischämie:

Die Ausscheidung der Nierenenzyme NAG und AAP war durch unterschiedliche Kurvenverläufe gekennzeichnet (s. Abb. 15;17;19):

Im Vergleich zur AAP war die Exkretionskurve der intrazellulär-lysosomal lokalisierten NAG mehr durch Ausscheidungsschübe charakterisiert. Die auf die Creatininkonzentration im Urin bezogenen Enzymaktivitäten zeigten Spitzen innerhalb der ersten 2 h (2 Kontroll- und je 4 ATP- bzw. Adenosin-infundierte Tiere) und am 1. oder 2. Tag nach Wiederherstellung der Organperfusion (2 Kontrolltiere, 5 ATP- und 3 Adenosin-infundierte Tiere). Ihre Werte waren gegenüber den entsprechenden vor Ischämie (Bereich: 7 bis 100 U/g Crea., Median 37,85 U/g Crea., N = 16) bis zum 20-fachen erhöht. Vom 2. bis 7. Tag nach Ischämie schwankten die Werte im Mittel zwischen 5 und 40 U/g Crea..

Wurden die Enzymaktivitäten von NAG auf das Urinzeitvolumen bezogen, traten die Exkretionsmaxima nicht so prägnant in den Vordergrund. Die Kurve hatte eher einen undulierenden Verlauf mit Werten zwischen 0 und 10 mU/min. in den ersten 4 post-ischämischen Stunden (1 Kontrolltier, je 4 ATP- bzw. Adenosin-infundierte Tiere) und zwischen 0,5 und 5 mU/min. (1 Kontrolltier, 5 ATP- und 2 Adenosin-infundierte Tiere) ab dem 2. bis 7. Tag post-ischämisch. Die Vergleichswerte vor Is-

chämie lagen für alle Tiere zwischen 2,32 und 24,5 mU/min.. Zumindest für die ATP-infundierten Hunde lag die NAG-Ausscheidung am 7. Tag signifikant unter derjenigen vor Ischämie, bei ebenfalls signifikant niedrigerer Inulin-Clearance (jeweils: $p \leq 0,05$; s. Tab. 15). Bei den anderen Tieren waren für den Nachweis nicht genügend Daten vorhanden.

Das Bürstensaumenzym AAP erreichte innerhalb der ersten 2 h nach post-ischämisch beginnender Urinproduktion sein Ausscheidungsmaximum und fiel dann kontinuierlich ab. Die höchsten gemessenen Urinaktivitäten übertrafen die Werte vor Unterbrechung der Nierendurchblutung um das 14 bis 2.200- (U/g Crea.) bzw. um das 1 bis 800-fache (mU/min.). Bei 8 von 16 Tieren gelangten die AAP-Aktivitäten nach 4 h (U/g Crea.) bzw. innerhalb des 1. Tages nach Ischämie (mU/min.) mit Größenordnungen zwischen 10 und 50 U/g Crea. bzw. 0,2 und 1,5 mU/min. in den Ausgangsbereich zurück. Am 7. post-ischämischen Tag lagen die Werte bei 8 von 13 überlebenden Tieren (1 Kontrolltier, 4 ATP- bzw. 3 Adenosin-infundierten Tieren) unter denen vor Ischämie. Das Ergebnis war, zumindest für die ATP-infundierten Hunde (bei den anderen waren für statistische Berechnungen die Anzahl der vorhandenen Werte nicht ausreichend), nicht signifikant (s. Tab 15).

Vergleich: Enzymurie von NAG und AAP, Inulinclearance und
Urinzeitvolumen bei uni-nephrektomierten Hunden
vor und am 7. Tag nach Unterbrechung der Nieren-
Durchblutung

uni-nephrektomierte Tiere

ATP-Infusion

N = 6

vor Ischämie

7. Tag nach
Ischämie

Signifikanz-
Niveau

<u>NAG:</u> mU/min. Bereich:	$\bar{x} = 5,03$ 3,09 bis 20,73	$\bar{x} = 2,83$ 1,88 bis 6,48	$p \leq 0,05$
<u>AAP:</u> mU/min. Bereich:	$\bar{x} = 0,56$ 0,07 bis 7,90	$\bar{x} = 0,45$ 0,08 bis 0,65	n.s.
<u>Inulinclearance:</u> ml/min. Bereich:	$\bar{x} = 53,9$ 35,9 bis 75,3	$\bar{x} = 6,3$ 1,2 bis 24,7	$p \leq 0,05$
<u>Urinzeit-Vol.:</u> ml/min. Bereich:	$\bar{x} = 0,27$ 0,05 bis 1,17	$\bar{x} = 0,41$ 0,17 bis 0,73	n.s.

Tab. 15

3.1.3. Effekte der post-ischämischen intra-renalen Infusion von ATP-MgCl₂ oder Adenosin auf Nierenfunktionsparameter und Enzymurie von NAG und AAP:

Alle Tiere, welche post-ischämisch intra-renal ATP-MgCl₂ oder Adenosin erhalten hatten, überlebten den Beobachtungszeitraum von 7 Tagen, während 3 der 5 Hunde, welchen zur Kontrolle NaCl 0,9 % infundiert worden war, vorzeitig in der Urämie verstarben. Dienemann, Hesse und Mitarbeiter (Lit.: 114-118) konnten zeigen, daß die Behandlung mit Adeninnucleotiden schon innerhalb der ersten 24 h und an den folgenden Tagen die Glomeruläre Filtrationsrate GFR (Inulin-clearance) und die fraktionale Na-Reabsorption signifikant zu steigern vermag (jeweils: $p \leq 0,05$). Auch das Harnkonzentrierungsvermögen war am 1. Tag nach Ischämie signifikant verbessert ($p \leq 0,05$).

Dagegen fanden sich bei den Untersuchungen des Urinzeitvolumens, der Creatininkonzentration und der Enzymaktivitäten im Harn keine deutlichen Unterschiede; lediglich am 1. Tag nach Ischämie war die AAP-Ausscheidung nach Adenosininfusion gegenüber den Kontrolltieren signifikant vermindert ($p \leq 0,05$; s. Tab. 16).

Ein Vergleich dieser Parameter zwischen ATP-MgCl₂- und Adenosin-infundierten Hunden erbrachte keine signifikanten Differenzen.

Vergleich: Einfluß der post-ischämischen Adenosin-Infusion
auf die Enzymurie von NAG und AAP
bei uni-nephrektomierten Hunden

- 1 Tag nach Ischämie -

<u>Kontroll-Tiere</u>	<u>Adenosin-infund.</u>	<u>Signifikanz-</u>
(NaCl-Inf.)	<u>Tiere</u>	<u>Niveau</u>
N = 5	N = 5	

<u>NAG:</u> mU/min. Bereich:	$\bar{x} = 4,22$ 0,00 bis 7,91	$\bar{x} = 3,00$ 0,00 bis 15,54	n.s.
<u>AAP:</u> mU/min. Bereich:	$\bar{x} = 0,28$ 0,00 bis 8,32	$\bar{x} = 0,85$ 0,09 bis 3,49	$p \leq 0,05$

3.2. Adeninnucleotid-Infusion bei Tieren mit beidseits erhaltenen Nieren:

Narkotisierte und mechanisch beatmete Hunde bekamen nach 70 min. dauernder, beidseitiger Nierenischämie in die rechte A. renalis NaCl 0,9 % (Kontrollorgan) und in die linke A. renalis (Testorgan) ATP-MgCl₂- (6 Tiere) bzw. Adenosinlösung infundiert, letztere entweder allein oder bei begleitender Captopril-Behandlung (jeweils 5 Tiere). Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 6 Stunden.

Die Abb. 20 bis 25 zeigen die Kurvenverläufe des Urinzeitvolumens, der Creatininkonzentration im Harn, der Inulinclearance und der Enzymurien von NAG und AAP, wobei auch hier 'Streuungsbreiten' (dünne Linien) und Mediane (dicke Linien) eingezeichnet sind. Ihre Merkmale und Tendenzen entsprechen denen, wie sie im Rahmen der Versuchsreihe mit uni-nephrektomierten Hunden beschrieben wurden (s. unter 3.1.1. und 3.1.2.). Bei den uni-nephrektomierten Tieren fielen jedoch vor Unterbrechung der Nierendurchblutung signifikant höhere NAG- und AAP-Aktivitäten im Urin auf (NAG: $p \leq 0,001$; AAP: $p \leq 0,05$ s. Tab. 17). Für die übrigen Untersuchungsgrößen war kein Unterschied nachweisbar.

Im intraindividuellen Vergleich der Kontroll- und Testorgane konnten Dienemann, Hesse und Mitarbeiter (Lit.: 118) unter postischämischer Adeninnucleotid-Behandlung wiederum eine signifikant bessere Erholung der

EXPERIMENTELLES AKUTES NIERENVERSAGEN an Hunden

Tiere mit beidseits erhaltenen Organen:

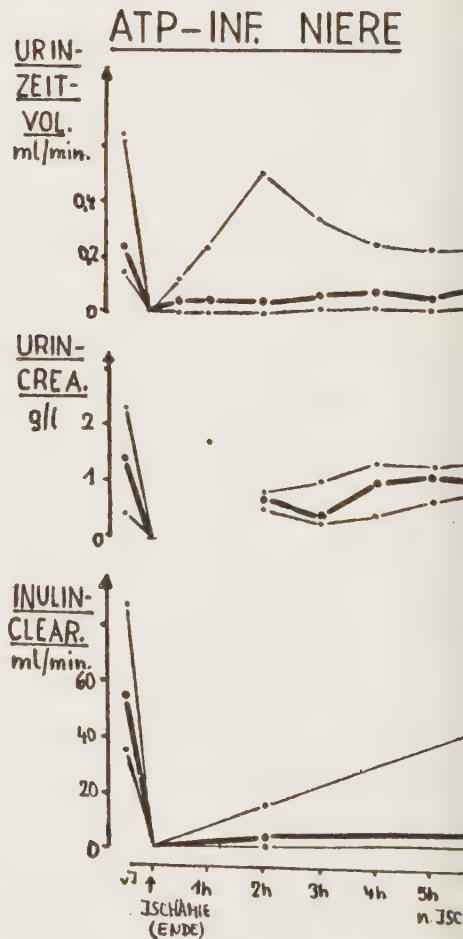
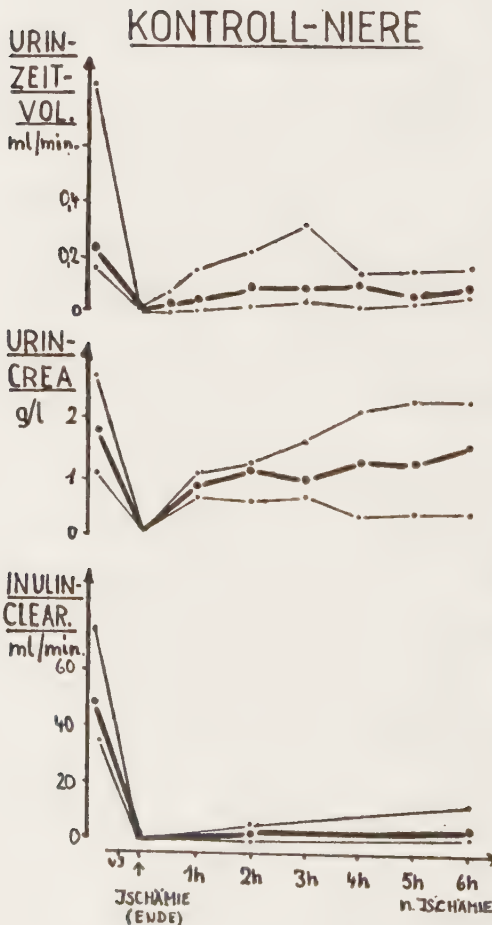
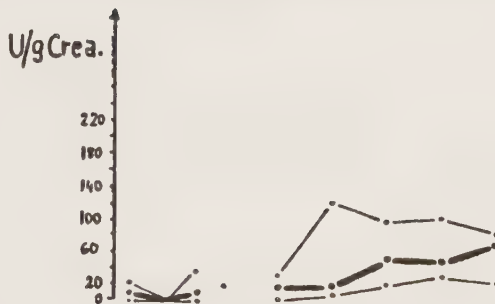
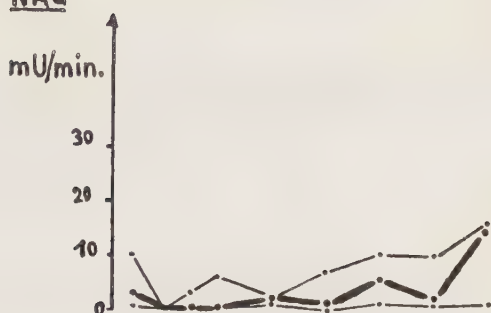


Abb. 20

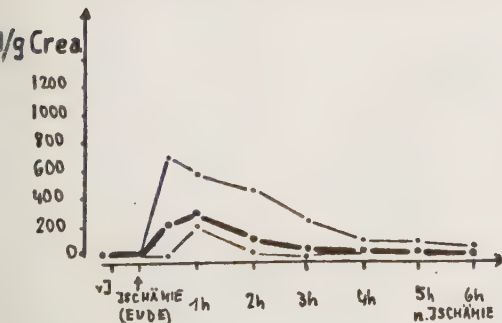
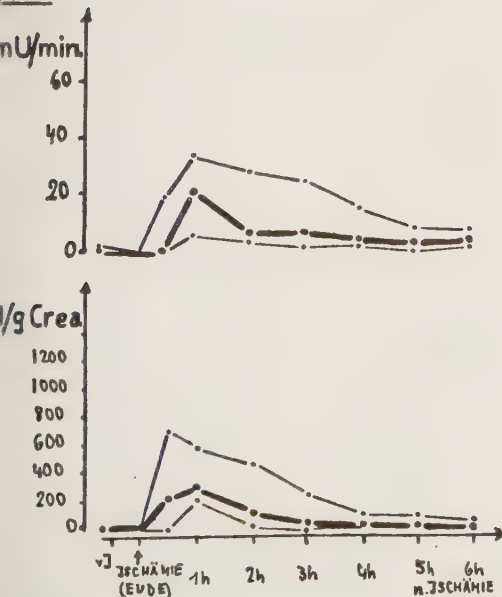
NAG



NAG



AAP



AAP

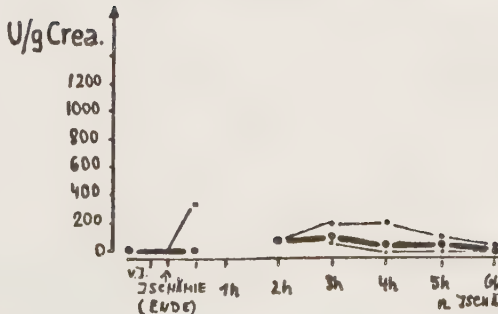
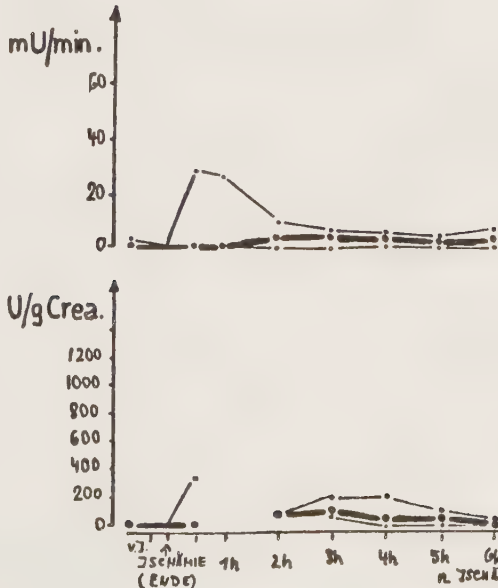


Abb. 21

EXPERIMENTELLES AKUTES NIERENVERSAGEN an Hunden

Tiere mit beidseits erhaltenen Organen:

KONTROLL-NIERE

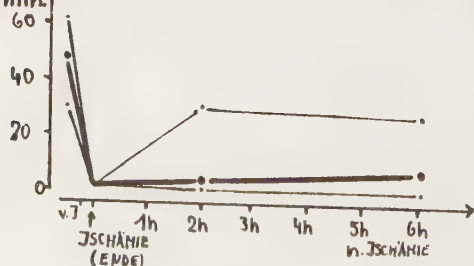
URIN-
ZEIT-
VOL.
ml/min



URIN-
CREA.
g/l



INULIN-
CLEAR.
ml/min



ADENOSIN-INF. NIERE

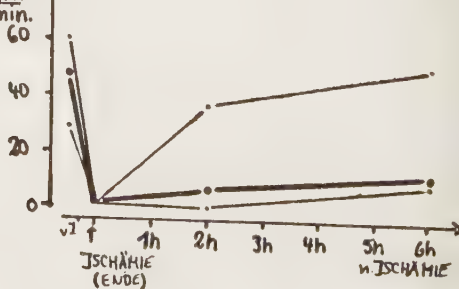
URIN-
ZEIT-
VOL.
ml/min



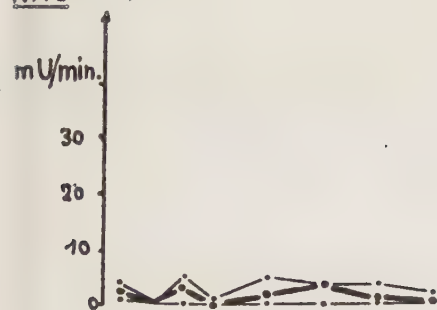
URIN-
CREA.
g/l



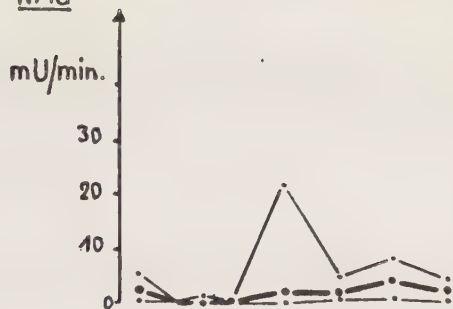
INULIN-
CLEAR.
ml/min



NAG



NAG



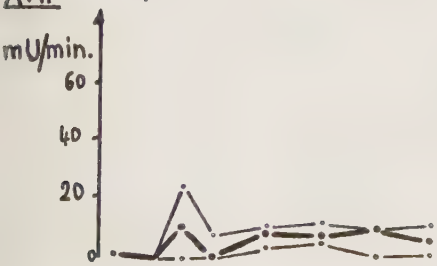
U/g Crea.



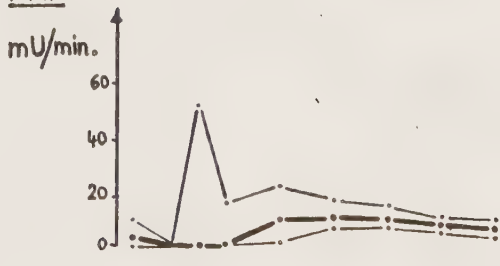
U/g Crea.



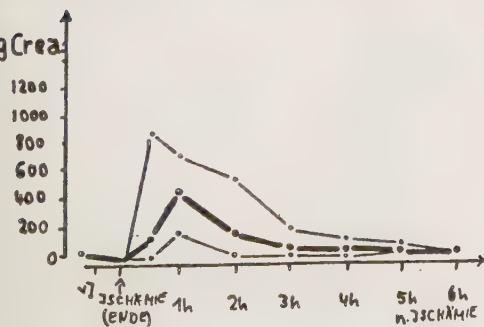
AAP



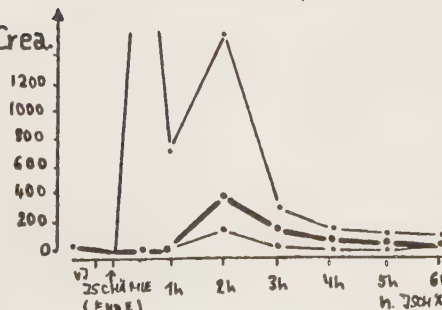
AAP



U/g Crea.



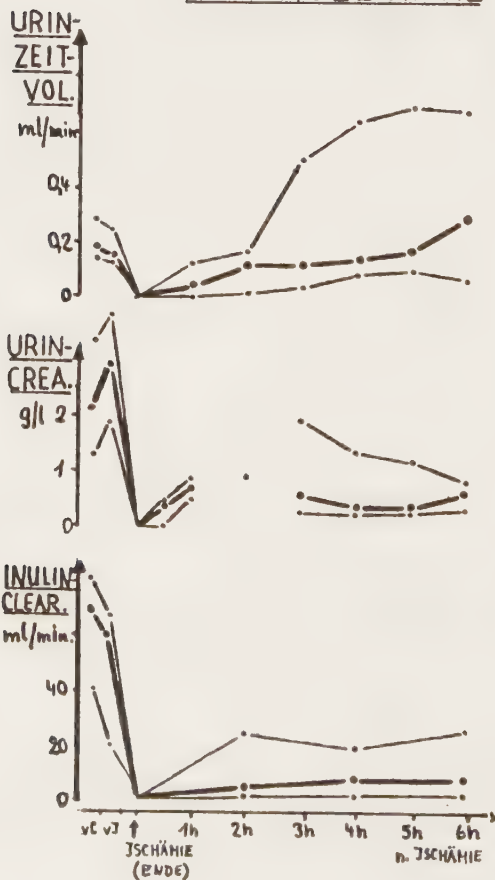
U/g Crea.



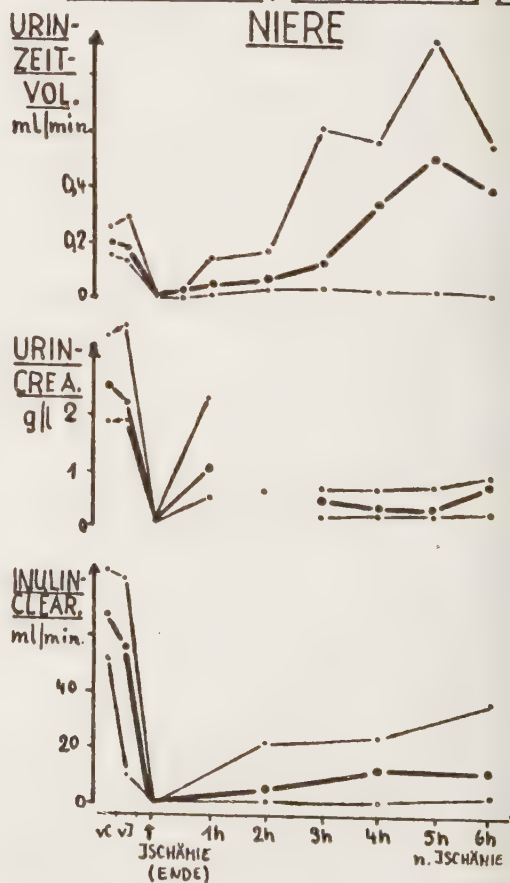
EXPERIMENTELLES AKUTES NIERENVERSAGEN an Hunden

Tiere mit beidseits erhaltenen Organen:

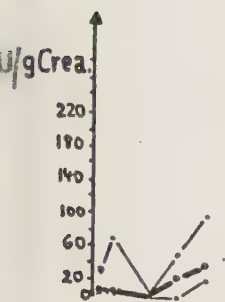
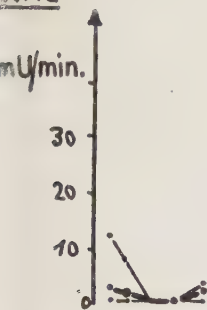
KONTROLL-NIERE



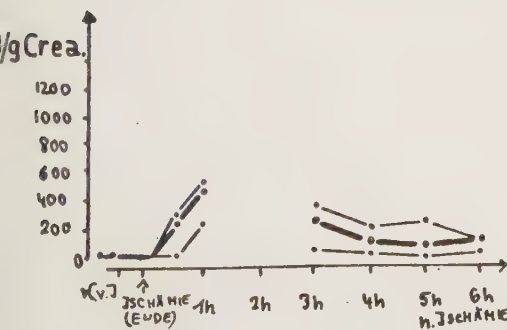
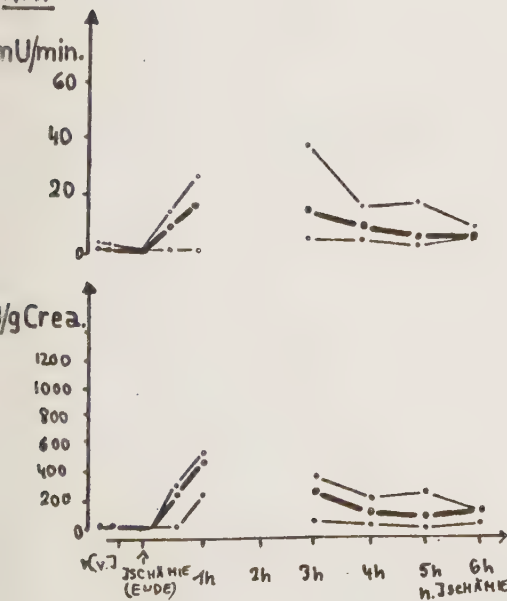
CAPTOPRIL-/ADENOSIN-I-NIERE



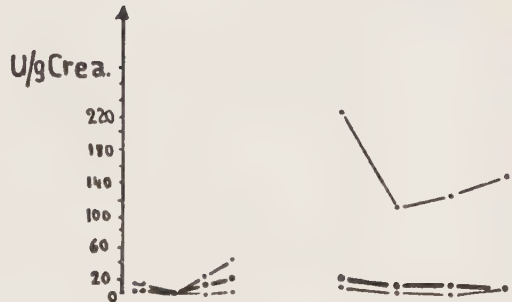
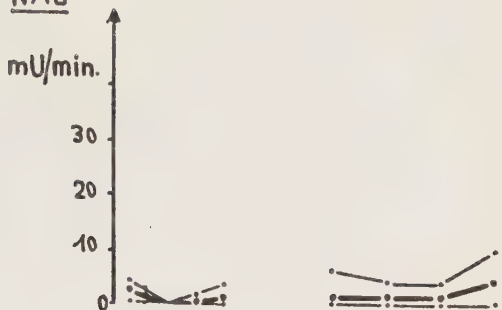
NAG



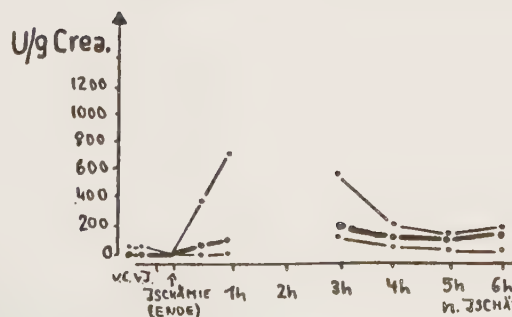
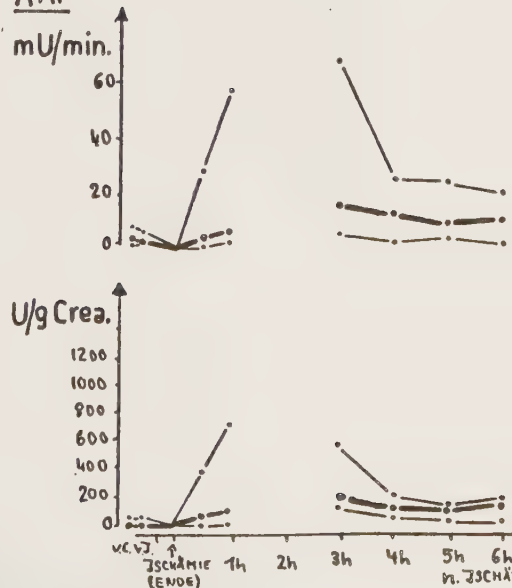
AAP



NAG



AAP



Vergleich: Einfluß der Nephrektomie auf die Enzymurien
von NAG und AAP

- Vergleich der Werte vor Ischämie -

<u>Tiere m. beid-</u> <u>seits erhaltenen</u>	<u>uni-nephrekto-</u> <u>mierte</u>	<u>Signifikanz-</u>
<u>Nieren</u>	<u>Tiere</u>	<u>niveau</u>
$N^* = 16$	$N = 16$	

<u>NAG:</u> mU/min. Bereich:	$\tilde{x} = 1,75$ 0,30 bis 4,93	$\tilde{x} = 6,64$ 2,32 bis 24,50	$p \leq 0,001$
<u>AAP:</u> mU/min. Bereich:	$\tilde{x} = 1,12$ 0,20 bis 3,63	$\tilde{x} = 1,89$ 0,01 bis 7,90	$p \leq 0,05$

*)
arithmetische Mittelwerte von zwei Nieren

Nierenfunktion feststellen. Die ergänzend durchgeführten histologischen Untersuchungen ergaben signifikant weniger Einzelzellnekrosen im proximalen Konvolut bei ATP-MgCl₂- und Adenosin-Infusion, sowie einen signifikant geringeren Bürstensaumverlust im proximalen Konvolut nach Adenosin-gabe (jeweils: $p \leq 0,05$). Wurde zusätzlich zu Adenosin Captopril infundiert, waren außerdem signifikant weniger Einzelzellnekrosen im S₃-, TAL- und DCT-Segment zu verzeichnen ($p \leq 0,05$).

Da für die Bestimmung der Enzymurien nicht genügend Probenmaterial vorhanden war, konnten in der statistischen Auswertung innerhalb der drei Testgruppen nur die 3-h-Werte der beiden Nieren nach Ischämie miteinander verglichen werden. Während sich Urinzeitvolumen, Inulinclearance, sowie Creatininkonzentration und NAG-Aktivität im Harn nicht signifikant unterschieden, war die AAP-Ausscheidung nach Adenosin-Infusion signifikant erhöht ($p \leq 0,05$; s. Tab. 18).

Vergleich: Enzymurie von NAG und AAP bei Hunden mit beidseits
erhaltenen Nieren

- Vergleich der Werte 3 h nach Ischämie -

<u>Kontroll-Niere</u>	<u>Adenosin-infund.</u>	<u>Signifikanz-</u>
	<u>Niere</u>	<u>Niveau</u>
N = 5	N = 5	

<u>NAG:</u> mU/min. Bereich:	$\bar{x} = 0,68$ 0,00 bis 4,08	$\bar{x} = 1,80$ 0,71 bis 6,16	n.s.
<u>AAP:</u> mU/min. Bereich:	$\bar{x} = 5,33$ 0,00 bis 11,46	$\bar{x} = 10,05$ 6,68 bis 17,78	$p \leq 0,05$

E. Diskussion

1. Methodik

Die dieser Arbeit als Grundlage dienenden Verfahren der Aktivitätsmessungen von NAG und AAP im Urin sind in der Vergangenheit standardisiert und häufig erprobt worden. Sie bereiten methodisch keine großen Probleme (Lit.: 3; 11; 12; 14; 16; 17; 25; 27-30; 35; 37; 48; 52).

Anders verhält es sich mit der Vorbehandlung der Proben. Verschiedene Autoren haben auf die Existenz von Substanzen im Harn aufmerksam gemacht, die in wechselnden Konzentrationen vorkommen und einerseits das Enzymbestimmungsverfahren beeinträchtigen (z.B. Urochrome), andererseits enthaltene Enzyme aktivieren oder hemmen können (Lit.: 11; 25; 35; 38; 40; 41; 45; 46). Ihre Identifizierung ist bisher nur bruchstückhaft gelungen. So werden bei der NAG u.a. Bilirubin, Hämoglobin und Acetylsalicylsäure für die Enzyminhibition verantwortlich gemacht (Lit.: 25). Über 50 % der im Rohharn gefundenen Hemmung der AAP sollen zu Lasten von Histidin, NH_3 und Phenylalanin gehen (Lit.: 45-47).

Bisher konnte noch kein ideales Verfahren entwickelt werden, das alle Störsubstanzen eliminiert. In Anwendung und Diskussion halten sich insbesondere die hochtourige Zentrifugation, die Harnverdünnung, die Dia-

lyse, die Gel- und Ultrafiltration und die Gelchromatographie, sowie Kombinationen dieser Techniken (Lit.: 11; 25; 29; 35; 37-41; 45; 46; 50; 53; 65; 66).

Im Rahmen der Diabetiker-Studie erwies es sich als zweckmäßig, die Urinproben einer Gelfiltration zu unterziehen, nachdem sie durch hochtouriges Zentrifugieren (10.000 x g über 10 min.) von Zellen, Zellbruchstücken und Kristallen befreit worden waren. Die Vorteile dieser Methode lagen vor allem darin, daß sie neben einer weitgehenden Entfernung von Urochromen und niedermolekularen Störsubstanzen auch eine partielle Abtrennung von Pharmaka ermöglicht (Lit.: 40; 41). Der Zeitaufwand mit durchschnittlich 2-5 min je Probe war in einem vertretbaren Bereich.

Die von Trübungen und Urochromen gereinigten Eluate eigneten sich außerdem für die nephelometrische Albuminbestimmung. Allerdings mußte dabei ihr Verdünnungsfaktor (0,5) berücksichtigt werden.

Die Verwendung von Reagenzgläsern, deren Wände mit 20 %-iger Rinderalbumin-NaCl-Lösung benetzt waren, sollte eine Abscheidung von Humanalbumin aus der Probe verhindern.

Bei der Messung der Enzymaktivitäten in den Hunde-Urinen mußte wegen zu geringer Harnmengen auf die Gelfiltration verzichtet werden. Alternativ wurden Verdünnungen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auf 1:6 bis 1:24 hergestellt. Der Verdünnungsgrad orientierte sich an der Probenmenge, der

enthaltenen Enzymaktivität (aus meßtechnischen Gründen waren Verdünnungen dann erforderlich, wenn die Enzymaktivitäten 20 U/ml überstiegen) und der Konzentration der Urochrome, die das Bestimmungsverfahren durch Erhöhung der Leerwerte beeinträchtigten. Um diesen Effekt auszuschalten, wurde bei der kinetischen AAP-Aktivitätsmessung die enzymatisch bedingte Extinktionszunahme direkt von einem an das Photometer angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet.

2. Enzym- und Albuminurie beim Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus zählt zu den häufigsten chronischen Stoffwechselerkrankungen des Menschen, insbesondere der westlichen Wohlstandsnationen. In der Bundesrepublik Deutschland liegt die Morbidität derzeit zwischen 2 und 4 %. Mit zunehmender Ausbildung von degenerativ-proliferativen Veränderungen an Arterien, Arteriolen und Kapillaren entwickelt sich ein schillerndes Krankheitsbild. Dabei ist die diabetische Nephropathie mit Hypertonie und terminaler Niereninsuffizienz - neben diabetischer Neuro- und Retinopathie - als schwerwiegendste Spätkomplikation anzusehen. Sie gilt als häufigste Todesursache bei Patienten mit juvenilem Diabetes mellitus (Lit.: 105).

Auf der Suche nach Untersuchungsgrößen, die schon frühzeitig eine Nierenbeteiligung aufzudecken vermögen, ist von verschiedenen Autoren darauf hingewiesen worden, daß erhöhte Enzym- und Albuminurien bei Diabetikern ohne klinische Symptomatik auftreten können (Lit.: 8;31; 68;69;88;90;96-99;107;108;110). Diese Erkenntnis bestätigte sich auch in den vorliegenden Untersuchungen: In den Urinen von 11 Typ-I-Diabetikern mit einer Krankungsdauer von weniger als 1 Jahr und guter Stoffwechseleinstellung (fehlende Glucos- und Ketonurie, Hb A₁ und GSP im Normbereich) ergaben sich pathologische Ausscheidungswerte für NAG und AAP in 9,0 bzw. 54,5 % und

für Albumin in 18,0 % der Fälle.

Akute und chronische Stoffwechselentgleisungen verschlechterten die Werte weiter: Kurzzeitig andauernde Glucosurien erhöhten die Wahrscheinlichkeiten für pathologische AAP- und Albuminausscheidungen. Bei (hinzukommenden) Ketonurien wurden auch verstärkt Hyperenzymurien der NAG beobachtet. Darüber hinaus bestanden enge Beziehungen zu den Stoffwechsel-Langzeitparametern Hb A₁ und GSP. Eine Überschreitung ihrer Normalwerte bewirkte einen sprunghaften Anstieg der Wahrscheinlichkeiten für pathologische Harnenzym- und Albuminwerte.

Wie aus dem Verlauf der beiden Typ-II-Diabetiker mit akut dekompensierter Stoffwechsellage hervorging, können sich die Enzym- und Albuminausscheidungen unter Therapie mit Erreichen der Normoglycämie wieder normalisieren. Über ähnliche Beobachtungen haben auch schon andere Autoren berichtet (Lit.: 5;8;55;61;67;90;96-98).

Allerdings scheint - zumindest für den Typ-I-Diabetes - diese Phase der therapeutisch reversiblen Hyperenzym- und -albuminurien zeitlich begrenzt zu sein: Während für alle drei Parameter 5 bis 10 Jahre nach Beginn der Erkrankung bei schlechter Stoffwechseleinstellung (Glucos- und/oder Ketonurie positiv; Hb A₁ und GSP pathologisch versus sämtliche Parameter im Normbereich) signifikant höhere Werte festgestellt wurden - für NAG zusätzlich während des Zeitraums unter 5 Jahren - diskriminierte nach über 10 Jahren nur mehr Albumin signifikant zwischen guter und schlechter Stoffwechseleinstellung

($p \leq 0,01$); für die NAG war der Unterschied lediglich statistisch auffällig ($p \leq 0,05$).

In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß die AAP auf Stoffwechselentgleisungen offenbar empfindlicher zu reagieren scheint, als die NAG; die Erhöhung der Enzymurie fiel vergleichsweise markanter aus (s. Fallbeispiele), außerdem war das Niveau der Wahrscheinlichkeiten für pathologische Enzymurien - auch bei Diabetikern mit kontrollierter Stoffwechsellage - durchweg höher. Es liegt nahe, als Ursache dafür kontinuierliche Schädigungen der Bürstensaummembran, z.B. infolge osmotischer Alterationen durch Glucose- und Ketonkörper-haltigen Harn anzunehmen, für die die AAP aufgrund ihrer exponierten Lokalisation an der Bürstensaum-Oberfläche (Lit.: 59) besonders empfänglich anmutet (Lit.: 49). Enzyminduktive Effekte könnten allerdings auch von den vermehrt glomerulär filtrierte Proteinen (z.B. Albumin) ausgehen.

Bei guter Stoffwechseleinstellung trat eine Abhängigkeit der NAG- und AAP-Ausscheidung von der Diabetesdauer zu Tage. Mit Überschreitung der 10-Jahres-Schwelle ergaben sich im Vergleich zu kürzerem Bestehen der Erkrankung signifikant höhere Harnaktivitäten. Bei entgleisten Patienten dürfte dieses Phänomen durch stoffwechselbedingte Hyperenzymurien überlagert worden sein.

Höhere Enzymausscheidungen wurden auch bei Verschlechterung der Nierenfunktion und des Augenhintergrundbefundes verzeichnet. Dabei fielen besonders die

signifikanten Enzymurie-Anstiege der NAG am Übergang der Retinopathie Grad II in Grad III (Entwicklung irreversibler Gefäßveränderungen) und bei Anzeichen einer beginnenden Nephropathie (Verminderung der GFR unter 70 ml/min. bei einer Albuminurie über 10 mg/g Crea.) auf. Es wäre denkbar, daß die am Augenhintergrund sichtbaren angiosklerotischen Veränderungen parallel an der Niere vorliegen und dort, durch ischämische Schädigung der Tubuluszellen, zur verstärkten Freisetzung der NAG beitragen.

Zusammenfassend sei festgestellt, daß die bei Diabetikern im Verlauf der Erkrankung immer wieder auftretenden Hyperglycämien und damit verbundenen Glucos- und Ketonurien schon frühzeitig zu Schädigungen des glomerulären Filters (Erhöhung der Durchlässigkeit für Albumin) und zu Alterationen der Zellen des proximalen Tubulus führen. Ob die vermehrte Freisetzung der Enzyme mehr auf direkte Zellschädigungen oder auf indirekte, induktive Effekte zurückzuführen sind, oder - in den Spätstadien - durch vermehrte glomeruläre Filtration der entsprechenden Serum-Enzyme zustande kommt, müssen zukünftige Untersuchungen klären.

Klinische Bedeutung könnte die Bestimmung von Nierenenzym-Aktivitäten und Albuminkonzentrationen im Harn bei der prognostischen Bewertung der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie erhalten. In der vergleichenden Auswertung wurden innerhalb dieser Arbeit die in der Literatur (12;85-87) veröffentlichten Normalwerte heran-

gezogen. Wegen ihrer hohen Empfindlichkeit gegenüber der Stoffwechsellage (insbesondere der AAP) und der dynamisch fortschreitenden Nierenveränderungen erhebt sich die Frage, ob für die klinische Praxis nicht erweiterte Referenzbereiche für Diabetiker in Abhängigkeit eines Nierenfunktionsparameters (z.B. der Creatininclearance) eingeführt werden sollten. Dazu müßten allerdings exakte Untersuchungen der intra- und inter-individuellen Streubreiten der Enzym- und Albuminurien unter kontrollierten Bedingungen bei zeitlich engmaschiger, korrelierter Stoffwechsel- und Nierenfunktionsüberwachung durchgeführt werden.

Für die längerfristige Prognose einer diabetischen Nierenschädigung scheint also nicht so sehr die Höhe der Enzym- und Albuminausscheidung bei gelegentlicher Befunderhebung entscheidend, vielmehr sollte der Grad der Reversibilität und die verbleibenden Werte bei stabiler Stoffwechseleinstellung in die Beurteilung einfließen.

3. Enzymurie beim experimentellen akuten Nierenversagen an Hunden

Als häufigste Ursache eines akuten Nierenversagens werden heute renale Ischämien angesehen, die infolge einer Kreislaufzentralisation, z.B. bei hohen Blutverlusten, Volumenmangelzuständen oder plötzlichen Blutdruckabfällen (Schock), ausgelöst werden können (Lit.: 112).

Die operative Unterbrechung der renalen Blutzufuhr in den Versuchen von Dienemann, Hesse und Mitarbeitern (Lit.: 114-118) an Hunden, die in die vorliegende Arbeit mit eingingen, hat in sofern Modellcharakter, als es hier wie dort, durch Verarmung an energiereichen Phosphatverbindungen, zu Schädigungen der Tubuluszellen mit Zellschwellungen, Bürstensaumverlusten, Labyrinthweiterungen und Einzelzellnekrosen kommt. Ihre morphologische und funktionelle Manifestation tritt allerdings erst zum Zeitpunkt der renalen Wiederdurchblutung in Erscheinung, wenn die Nierentubuli nicht in der Lage sind, durch resorptive Vorgänge an den Epithelzellen den Primärharn zu konzentrieren (Lit.: 112;119).

In den Versuchen wurde dies erkennbar, wenn, z.T. nach kurzer anurischer Phase, die Urinproduktion wieder einsetzte (Anstieg der Inulinclearance), die Creatinin-konzentration im Urin jedoch stark vermindert war.

Zwischen der 2. und 3. post-ischämischen Stunde nahm auch die Creatininkonzentration im Urin, bei weiter

steigendem Urinzeitvolumen, zu. Dies deutete darauf hin, daß sich, neben der glomerulären Filtrationsleistung, auch das tubuläre Resorptions- und Konzentrierungsvermögen der Nieren zu erholen begann.

Die von verschiedenen Autoren vorgeschlagene Wahl der Creatininkonzentration in der Urinprobe als Bezugsgröße für die Harnenzymaktivitäten einzusetzen (Lit.: 3; 29;30;35;50;53;65), erwies sich als problematisch, weil sich das Harnkonzentrierungsvermögen der geschädigten Nieren ständig änderte und auch von Tier zu Tier unterschiedlich entwickelte. So konnte eine vergleichsweise hohe Creatininkonzentration, bedingt durch ein vermindertes Urinvolumen, die 'wahre Enzymausscheidung' verzerren. Umgekehrt traten ähnliche Effekte auf. Deshalb wurde als Bezugsgröße für die Enzymurien die Ausscheidungszeit zugrunde gelegt.

Die Ausscheidungsprofile der beiden Nierenenzyme NAG und AAP in der Anfangsphase der post-ischämischen Erholung der Nierenfunktion waren unterschiedlich. Das Bürstensaumenzym AAP zeigte besonders in den ersten Minuten und Stunden nach wieder einsetzender Urinproduktion deutlich erhöhte Harnaktivitäten, während diejenigen der intrazellulär lokalisierten NAG gegenüber den Werten vor Ischämie nur mäßig verändert waren. Damit scheint auch hier die AAP das empfindlicher reagierende Enzym von beiden zu sein.

Ab dem 2. bis 7. post-ischämischen Tag wurden für die NAG und AAP teilweise signifikant niedrigere Harnak-

tivitäten gemessen als vor Ischämie ($p \leq 0,05$). Histochemische Untersuchungen müssen klären, ob die Enzyme aufgrund mangelnder 'Spülung' in den Lumina der Nierentubuli verblieben und deshalb nicht vollständig ausgeschieden worden sind. Es wäre aber auch denkbar, daß die 90 bzw. 70 min. dauernde Ischämie der Nieren so massive Zellschäden gesetzt hat, daß die Enzymausscheidung wegen der verloren gegangenen Enzymausstattung der Tubuluszellen vermindert war.

Bei den uni-nephrektomierten Tieren der Langzeit-Versuche lagen die Enzymurien von NAG und AAP vor Ischämie signifikant über den entsprechenden Werten der nicht-nephrektomierten Tiere aus den Kurzzeit-Versuchen ($p \leq 0,001$ bzw. $p \leq 0,05$). Als mögliche Ursachen könnten Spätfolgen der 3 Wochen zurückliegenden Operation (z.B. Zelluntergänge mit Enzymfreisetzungen im Bereich der Tubuli) oder Vorgänge im Zusammenhang mit der post-operativen Hypertrophie der Restnieren in Frage kommen. Zu überlegen wären erhöhte Enzymurien bedingt durch Enzyminduktion als Folge verstärkter Resorptions- und Konzentrationsleistungen des verbliebenen Organs.

Mit ihren Untersuchungen konnten Dienemann, Hesse und Mitarbeiter nachweisen, daß die post-ischämische Infusion von Adenosin und ATP-MgCl_2 die Glomeruläre Filtrationsrate GFR (Inulin-clearance), die tubuläre Na-Reabsorption und das Harnkonzentrationsvermögen der geschädigten Nieren signifikant verbessern konnte. Keines der behandelten Tiere verstarb in der Urämie. Auch hi -

stologisch zeigten sich signifikant geringere Zellschädigungen (jeweils: $p \leq 0,05$). Sie schlossen daraus, daß die einmalige Gabe von Adenosin oder ATP-MgCl_2 im Anschluß an eine Nierenischämie die normalerweise fortschreitenden Zelluntergänge verlangsamten oder sogar verhindern und damit die post-ischämische Erholung der Nierenfunktion beschleunigen könnte (Lit.: 114-118).

Diese Beobachtungen fanden keine Entsprechung in signifikant verminderten (geringere Zellschäden) oder signifikant vermehrten (z.B. durch Enzyminduktion bei beschleunigten Reparaturvorgängen) Enzymurien von NAG und AAP bei den Adeninnucleotid-behandelten Tieren oder Nieren. Auch dies könnte darauf hinweisen, daß nur ein Teil der freigesetzten Tubulusenzyme ausgeschieden worden ist.

Resümierend läßt sich feststellen, daß die Ausscheidungsmuster der Tubulusenzyme NAG, v.a. aber der AAP, zwar eine ischämische Nierenschädigung anzeigen, daß aber ohne zusätzliche Untersuchungen keine Differenzierung über die Art der Schädigung und über unmittelbar einsetzende Regenerationsvorgänge möglich ist.

F. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte sich die Aufgabe gestellt, die Ausscheidung tubulärer Nierenenzyme im Urin bei chronischen und akuten Nierenschädigungen, an den Beispielen einer sich entwickelnden diabetischen Nephropathie und eines experimentellen akuten Nierenversagens, zu untersuchen.

Es wurden 42 Typ-I-Diabetiker 1 Jahr lang monatlich ambulant einbestellt und - neben der Messung der Harnenzymaktivitäten - die Entstehung bzw. das Fortschreiten diabetischer Spätkomplikationen überwacht. Die Einbeziehung zweier akut entgleister Typ-II-Diabetiker ermöglichte die Beobachtung von Enzym- und Albuminurien unter therapeutischer Stoffwechsellnormalisierung.

Durch Beteiligung an einem tierexperimentellen Modellversuch ergab sich die Gelegenheit, die Ausscheidung der Nierenenzyme in der Erholungsphase eines akuten ischämischen Nierenversagens zu verfolgen.

Wegen ihrer etablierten Bestimmungsmethodik und der Lokalisation im Bereich des proximalen Tubulus, wurden die beiden Enzyme NAG und AAP ausgewählt. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß beide Enzyme in der Lage sind, chronische und akute Nierenschädigungen anzuzeigen. Allerdings können aus den Verläufen der Enzymurien keine Rückschlüsse auf Art und Mechanismen der Alterationen,

sowie auf nachfolgend einsetzende Regenerationsvorgänge gezogen werden.

Die an der Oberfläche der Bürstensaummembran lokalisierte AAP reagierte auf akute Schädigungen (Glucos- und Ketonurien, Ischämie) empfindlicher, als die intrazellulär, in den Lysosomen enthaltene NAG. Sie ist auch, im Gegensatz zu NAG und Albumin, bei Diabetikern mit kurzer Erkrankungsdauer, stabiler Stoffwechseleinstellung und ohne klinische Anzeichen einer diabetischen Spätkomplikation in über 50 % der Fälle erhöht. Deshalb haben NAG und Albumin im Hinblick auf prognostische Überlegungen eine höhere Aussagekraft als die AAP. Dabei sollten weniger gelegentlich bestimmte, absolute Werte, als vielmehr die Entwicklung und der Grad der Reversibilität pathologischer Enzym- und Albuminurien unter therapeutischen Bemühungen in die Beurteilung einfließen. Bei eingeschränkter glomerulärer und tubulärer Nierenfunktion empfiehlt es sich, statt der Creatininkonzentration im Urin, die Ausscheidungszeit als Bezugsgröße für Enzym- und Albuminausscheidungen heranzuziehen.

G. Literaturverzeichnis

I. Enzyme und Enzymurien

1. Barman, Thomas E.: "Enzyme Handbook", Vol. II., Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1969, pp. 589 und 603
2. Bergmeyer, H.-U.: "Methoden der enzymatischen Analyse", Bd.1, (3. Aufl.), Verlag Chemie Weinheim, Bergstraße 1974, pp. 987-988
3. Bergmeyer, H.-U.: "Methods of Enzymatic Analysis", Vol. V., (3rd. Edit.), Verlag Chemie Weinheim-Deerfield Beach-Florida-Basel 1984, pp. 2-14
4. Bourbouze, R.; Baumann, F.-C.; Bonvalet, J.-P. et al.: "Distribution of N-acetyl- β -D-glucosaminidase isoenzymes along the rabbit nephron", Kidney International, Vol. 25 (1984), pp. 636-642
5. Brouhard, B. H.; LaGrone, L.; Travis, L. B. et al.: "Response of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase to rapid decreases in blood glucose", Clin. Chim. Acta, 140 (1984), pp. 197-202
6. Burchardt, U.; Hempel, R.; Neef, L.: "Die diagnostische Wertigkeit von Enzymveränderungen in Serum und Harn bei Hyperthyreose", Z. f. med. Lab.-Diagn., 19 (1978), pp. 38-42
7. Burchardt, U.; Haschen, R. J.; Krosch, H.: "Clinical usefulness of enzyme determinations in urine", aus : Dubach, H. U. & Schmidt, U.: "Diagnostic Significance of Enzymes and Proteines in Urine" in der Reihe: "Current Problems in Clinical Biochemistry 9", Hans Huber Publishers Bern-Stuttgart-Wien 1979, pp. 106-112
8. Burchardt, U.: "Harnenzymausscheidung bei Erkrankungen der inneren Organe", Z. ges. Inn. Med., Jg. 38, Heft 21 (1983), pp. 565-570
9. Coonrod, D.; Paterson, P. Y.: "Urine beta-glucuronidase in renal injury. II. Excretion patterns in experimental staphylococcal pyelonephritis in rats", J. Lab. & Clin. Med., Vol. 73/1 (1969), pp. 17-24
10. Coward, R. A.; DeLamore, I. W.; Mallick, N. P. et al.: "Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase as an indicator of tubular damage in multiple myeloma", Clin. Chim. Acta, 138 (1984), pp. 293-298

11. Diener, U.; Knoll, E.; Langer, B. et al.: "Urinary excretion of N-acetyl- β -D-glucosaminidase and alanine aminopeptidase in patients receiving amikacin or cis-platinum", Clin. Chim. Acta, 112 (1981), pp. 149-157
12. Diener, U.; Knoll, E.; Ratge, D.: "Urinary Excretion of Alanine Aminopeptidase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase During Sequential Combination Chemotherapy", J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Vol. 20 (1982), pp. 615-619
13. Dreller, E.; Burchardt, U.: "Renale Enzymauscheidung bei Tumoren und Tumorthherapie", Z. ges. Inn. Med., Jg. 38, Heft 21 (1983), pp. 593-599
14. Edelmann, E.; Guder, W.; Walter, H. et al.: "Beziehungen zwischen Mikroalbumin- und Enzymurie und diabetischer Stoffwechseleinstellung", Vortrag im Rahmen der 19. Jahrestagung der Dt. Diabetesgesellschaft in München vom 30.05. bis 02.06.1984
15. Ellis, B. G.; Price, R. G.: "Urinary Enzyme Excretion During Renal Papillary Necrosis Induced In Rats With Ethyleneimine", Chem.-Biol. Interactions, 11 (1975), pp. 473-482
16. Emery, C.; Young, R. M.; Morgan, D. B. et al.: "Tubular damage in patients with hypokalaemia", Clin. Chim. Acta, 140 (1984), pp. 231-38
17. Gerstner, W.: "Mikroalbuminurie, Enzymurie und Stoffwechseleinstellung bei Typ-I-Diabetes während ergometrischer Belastung", Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München (in Vorbereitung)
18. Gibey, R.; Dupond, J.-L.; Henry, J.-C.: "Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) isoenzyme profiles: a tool for evaluating nephrotoxicity of aminoglycosides and cephalosporins", Clin. Chim. Acta, 137 (1984), pp. 1-11
19. Gonick, H. C.; Stiem, E. R.; Saldana, L. F.: "Comparison of serum and urine fibrin split products and urinary beta-glucuronidase in the diagnosis of renal transplant rejection", aus: Dubach, U. C. & Schmidt, U.: "Diagnostic Significance of Enzymes and Proteines in Urine" in der Reihe: "Current Problems in Clinical Biochemistry 9", Hans Huber Publishers Bern-Stuttgart-Wien 1979, pp. 257-273
20. Guder, W. G.; Ross, B. D.: "Enzyme distribution along the nephron", Kidney International, Vol. 26 (1984), pp. 101-111
21. Guder, W. G.; Heidland, A.: "Urine Analysis - Report on the Workshop Conference of the German Society for Clinical Chemistry and the Society of Nephrology in Würzburg, Oct. 25-26, 1985, veröffentlicht in: J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Vol. 24 (1986), pp. 611-620

22. Harzmann, R.; Heller, W., Bichler, K.-H. et al.: "The value of urinary enzyme diagnosis in urinary bladder carcinoma. Experimental and clinical research data", aus: Dubach, U. C. & Schmidt, U.: "Diagnostic Significance of Enzymes and Proteines in Urine", in der Reihe: "Current Problems in Clinical Biochemistry 9", Hans Huber Publishers Bern-Stuttgart-Wien 1979, pp. 113-121
23. Haschen, R.: "Enzymdiagnostik", (2.Auflage), G. Fischer Verlag Stuttgart-New York, 1981, pp. 20-21, 97
24. Hopwood, J. J.; Elliott, H.: "Urinary excretion of sulphated N-acetyl-hexosamines in patients with various mucopolysaccharidoses", Biochem.J. 229 (1985), pp. 579-586
25. Horak, E.; Hopfer, S. M.; Sunderman Jr., F. W.: "Spectrophotometric Assay for Urinary N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase Activity", Clin. Chem. 27/7 (1981), pp. 1180-1185
26. Hultberg, B.; Öckerman, P. A.; Nordén, N. E.: "Isoenzymes of Four Acid Hydrolases in Human Kidney and Urine", Clin. Chim. acta, 52 (1974), pp. 239-243
27. Jung, K.; Scholz, D.: "An Optimized Assay of Alanine Aminopeptidase Activity in Urine", Clin. Chem. 26/9 (1980), pp. 1251-1254
28. Jung, K.; Diego, J.; Scholz, D. et al.: "Urinary Enzyme Excretion by Renal-Transplant Recipients in Relation to Interval after Transplantation", Clin. Chem. 28/8 (1982), pp. 1762-1764
29. Jung, K.; Scholz, D.; Diego, J. et al.: "Harnenzymausscheidung bei nierentransplantierten Patienten", Z. ges. Inn. Med., Jg. 38, Heft 21 (1983), pp. 581-592
30. Jung, K.; Diego, J.; Strobelt, V.: "Diagnostic Significance of Urinary enzymes in Detecting Acute Rejection Crisis in Renal Transplant Recipients Depending on Expression of Results Illustrated Through the Example of Alanine Aminopeptidase", Clin. Biochem., 18 (1985) pp. 257-260
31. Jungmann, E.; Mondorf, A.W.; Scherberich, J. et al.: "Schädigung des tubulären Apparates der Niere bei pathologischer Glucosetoleranz", MMW 124/10 (1982), pp. 231-233
32. Kenny, A. J.; Maroux, S.: "Topology of Microvillar Membrane Hydrolases of Kidney and Intestine", Physiolog. Reviews 62/1 (1982) pp. 91-124
33. Kind, P.R.N.: "N-acetyl- β -D-glucosaminidase in urine of patients with renal disease, and after renal transplants and surgery", Clin. Chim. Acta, 119 (1982), pp. 89-97

34. Kind, P.R.N.: "N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG) Activity in Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE)", Poster presentation at "Clinical Chemistry Newcastle", 19.-22.04.1983
35. Knoll, E.; Wisser, H.; Rautenstrauch, H.: "Vergleichende Untersuchungen zur diagnostischen Wertigkeit von Diskelektrophorese der Urinproteine und N-Acetylglucosaminidaseausscheidung zur Erkennung von tubulären Nierenschädigungen bei chronischer Polyarthritits", J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Vol. 18 (1980), pp. 53-58
36. Krishna, K. S.; Kirubakaran, M. G.; Pandey, A.P. et al.: "Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase and Aminopeptidase N in the diagnosis of graft rejection after live donor renal transplantation", Clin. Chim. Acta, 150 (1985), pp. 69-85
37. Kuhlmann, J.; Seidel, G.; Grötsch, H.: "Die Alanin-Amino-Peptidase-Ausscheidung als Diagnostikum von Nierenerkrankungen ?", Diagnostik 16 (1983), pp. 27-29
38. Maruhn, D.: "Rapid Colorimetric Assay of β -Galactosidase and N-Acetyl- β -D-Glucosidase in Human Urine", Clin. Chim. Acta, 73 (1976), pp. 453-461
39. Maruhn, D.; Strozyk, K.; Gielow, L. et al.: "Diurnal Variations of Urinary Enzyme Excretion", Clin. Chim. Acta, 75 (1977), pp. 427-433
40. Maruhn, D.: "Preparation of urine for enzyme determinations by gel filtration", aus: Dubach, U. C. & Schmidt, U.: "Diagnostic Significance of Enzymes and Proteines in Urine" in der Reihe: "Current Problems in Clinical Biochemistry", Hans Huber Publishers Bern-Stuttgart-Wien 1979, pp. 22-30
41. Maruhn, D.: "Methodische Aspekte der Harnenzymologie", Z. ges. Inn. Med., Jg. 38, Heft 21 (1983), pp. 557-564
42. Maruhn, D.; Johannsen, G.; Paar, D.: "Partially Automated Assay of Urinary N-acetyl- β -D-Glucosaminidase", Poster presentation at "Clinical Chemistry Newcastle", 19.-22.04.1983
43. Maruhn, D.; Wehling, K.; Metz, U.: "A Stable Liquid Control Material for Urinary Enzymes", baki hamaabada, Israel J. f. Clin. Biochem. and Lab. Science, Vol. 4/1-3 (1985), p. 99
44. Mattenheimer, H.: "Enzymes in the Urine", Medical Clinics of North America, Vol. 55 (1971), pp. 1493-1507
45. Mattenheimer, H.: "Enzyminhibitoren im Urin: Kinetische Untersuchungen mit unbehandeltem, dialysiertem, gelfiltriertem und dialysiertem plus gelfiltriertem Urin", Manuskript vom Januar 1983

46. Mattenheimer, H.: "Identification of Inhibitors of Urinary Alanine Aminopeptidase (AAP)", baki hamaabada, Israel J. f. Clin. Biochem. and Lab. Science, Vol. 4/1-3 (1985), p. 99
47. Mattenheimer, H.: "Hemmung der Alanin-Amino-peptidase im Harn durch Aminosäuren" und "Ergänzungen zum Abstract 'Hemmung der Alanin-Amino-peptidase durch Aminosäuren'", Kleinkonferenz "Harnanalytik" der Dt. Gesellschaft für Klinische Chemie und der Gesellschaft für Nephrologie in Würzburg, 25./26.10.1985, veröffentlicht in: "Dt. Ges. f. Klin. Chemie e.V.-Mitteilungen", 3/86 (1986), Demeter Verlag, D-8032 Gräfelfing, pp. 143 und 144
48. Mondorf, A. W.; Breier, J.; Hendus, J. et al.: "Effect of Aminoglycosides on Proximal Tubular Membranes of the Human Kidney", Europ. J. Clin. Pharmacol., 13 (1978), pp. 133-142
49. Mondorf, A. W.: "Harnenzyme", Editorial der MMW, 124/10 (1982), p. 130
50. Peters, J. E.; Schneider, I.; Haschen, R. J.: "Bestimmung der L-Alanyl-Peptidhydrolase (Alanin-Amino-peptidase, Aminosäure-Arylamidase) im Menschlichen Harn", Clin. Chim. Acta, 36 (1972), pp. 289-301
51. Pierce, R. J., Price, R. G.; Marsden, A. M. et al.: "Urinary enzyme assays in toxicological studies in the rat and marmoset", aus: Dubach, U. C. & Schmidt, U.: "Diagnostic Significance of Enzymes and Proteines in Urine", in der Reihe: "Current Problems in Clinical Biochemistry 9", Hans Huber Publishers Bern-Stuttgart-Wien 1979, pp. 201-214
52. Preuss, H. C.; Edelmann, E.; Schleicher, E.; Guder, W. G.: "Überwachung der Nierenfunktion von Typ-I-Diabetikern durch Messung von Albumin und Harnenzymen", Kleinkonferenz "Harnanalytik" der Dt. Gesellschaft für Klinische Chemie und der Gesellschaft für Nephrologie in Würzburg, 25./26.10.1985, veröffentlicht in: "Dt. Ges. f. Klin. Chemie e.V. - Mitteilungen", 3/86 (1986), Demeter Verlag, D-8032 Gräfelfing, p. 135
53. Price, R. G.; Dance, N.: "The Excretion of N-Acetyl- β -Glucosaminidase and β -Galactosidase Following Surgery to the Kidney", Clin. Chim. Acta, 27 (1970), pp. 65-72
54. Price, R. G.: "Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) as an indicator of renal disease", aus: Dubach, U. C. & Schmidt, U.: "Diagnostic Significance of Enzymes and Proteines in Urine" in der Reihe: "Current Problems in Clinical Biochemistry 9", Hans Huber Publishers Bern-Stuttgart-Wien 1979, pp. 150-163

55. Price, C. P.; Foster, K., J.: "Serum and Urine Glucosidase Activities in Diabetes Mellitus", Clin. Biochem., 12 (1979), pp. 231-233
56. Raab, W. P.: "Enzymes and Isoenzymes in Urine", aus: Dubach, U. C. & Schmidt, U.: "Enzymes in Urine and Kidney", Hans Huber Publishers Bern-Stuttgart 1968, pp. 17-63
57. Raab, W. P.: "Die diagnostische Bedeutung der Bestimmung von Harnenzymaktivitäten", Z. klin. Chem. u. klin. Biochem., Jg. 9, Heft 2 (1971), pp. 143-154
58. Raab, W. P.: "Diagnostic Value of Urinary Enzyme Determinations", Clin. Chem., Vol. 18/1 (1972), pp. 5-19
59. Scherberich, J. E.; Mondorf, W. A.: "Beurteilung der Nephrotoxizität von Pharmaka über die Ausscheidung tubulusspezifischer Membranantigene und Enzyme", Z. ges. Inn. Med., Jg. 38, Heft 21 (1983), pp. 571-580
60. Schmid, H.; Mall, A.; Bockhorn, H.: "Lysosomal Modulations in Human Cortical Nephron Segments According to Different Functional Conditions", in: Dzúrik, R.; Lichardus, B.; Guder, W. G.: "Kidney Metabolism and Function", Martinus Nihoff Publishing Dordrecht-Boston-Lancaster 1985, pp. 282-288
61. Schmidt, I.; Duncan, B. B.; Gitelman, H. J. et al.: "High Levels of Urinary N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase (NAG) in Children with Diabetes: Frequency and Correlation with Glucose Control", Diabetes 1983, 32:30 A / 118 (Suppl.)
62. Simane, Z. J.; Breuer, J.: "Harnenzyme und andere quantitative Urinparameter im Tierversuch", J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Vol. 21 (1983), pp. 237-247
63. Viganò, A.; Assael, B. M.; Villa, A. D. et al.: "N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and NAG-isoenzymes in children with upper and lower urinary tract infections", Clin. Chim. Acta, 130 (1983), pp. 297-304
64. Warner, T. G.; deKremer, R. D.; Sjöberg, E. R. et al.: "Characterization and Analysis of Branched-chain N-Acetylglucosamyl-Oligosaccharides Accumulating in Sandhoff Disease Tissue", J. Biolog. Chem., 280/10 (1985), pp. 6194-6199
65. Wellwood, J. M.; Price, R. G.; Ellis, B. G. et al.: "A Note on the Practical Aspects of the Assay of N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase in Human Urine", Clin. Chim. Acta, 69 (1976), pp. 85-91
66. Werner, M.; Gabrielson, D.: "Ultrafiltration for Improved Assay of Urinary Enzymes", Clin. Chem. 23/4 (1977), pp. 700-704

67. Whiting, P. H.; Ross, I. S.; Borthwick, L.: "Serum and Urine N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase in Diabetics on Diagnosis and Subsequent Treatment, and Stable Insulin Dependent Diabetics", Clin. Chim. Acta, 92 (1979), pp. 459-463
68. Whiting, P. H.; Ross, I. S.; Borthwick, L.: "N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase Levels and Diabetic Microangiopathy", Clin. Chim. Acta, 97 (1979), pp. 191-195
69. Whiting, P. H.; Petersen, J.; Power, D. A. et al.: "Diagnostic value of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase, its isoenzymes and the fractional excretion of sodium following renal transplantation", Clin. Chim. Acta, 130 (1983), pp. 369-376

II. weitere Parameter

70. Berger, M.: "Diagnostische Wertigkeit des glycosylierten Hämoglobins (HbA1c)", Dt. Ärzteblatt, Jg. 81, Heft 18, Ausg. B (1984), pp. 1464-1466
71. Berger, M.; Reinauer, H.: "Diagnostische Wertigkeit des glycosylierten Hämoglobins (HnA1c)" - Stellungnahme und Schlußwort - Dt. Ärzteblatt, Jg. 81, Heft 40, Ausg. B (1984), p. 2898
72. Boucher, B. J.; Burrin, J. M.; Gould, B. J. et al.: "A Collaborative Study of Glycosylated Haemoglobin by Several Methods in Seven Laboratories in the United Kingdom", Diabetologia (1983), pp. 265-271
73. Goldstein, D. E.; Peth, S. B.; England, J. D. et al.: "Effects of Acute Changes in Blood Glucose on HbA1c", Diabetes, Vol. 29 (1980), pp. 623-628
74. Goldstein, D. E.; Parker, K. M.; England, J.D. et al.: "Clinical Application of Glycosylated Hemoglobin Measurements", Diabetes, Vol. 31 (1982), pp. 70-78 (Suppl.3)
75. BIO-Rad-Laboratories GmbH : "Hämoglobin A1c Säulentest zur Bestimmung des prozentualen Anteils von HbA1c im Vollblut" - Vorläufige Arbeitsanleitung vom November 1982
76. BIO-Rad-Laboratories GmbH : "BIO-Rad Hemoglobin A1c by Column Test for Measuring the Percentage of HbA1c in Whole Blood" - Instruction Manual April 1983

77. Kennedy, L.; Baynes, J. W.: "Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview", *Diabetologia*, 26/2 (1984), pp. 93-98
78. Mehl, T. D.; Enzel, S. E.; Russel, B. et al.: "Comparison of Two Indices of Glycemic Control in Diabetic Subjects: Glycosylated Serum Protein and Hemoglobin", *Diabetes Care*, Vol. 6/1 (1983), pp. 34-39
79. Schleicher, E.; Wieland, O. H.: "Specific Quantitation by HPLC of Protein (Lysine) Bound Glucose in Human Serum Albumin and Other Glycosylated Proteins", *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, Vol. 19 (1981), pp. 81-87
80. Schleicher, E.; Deufel, T.; Wieland, O. H.: "Non-Enzymatic Glycolysation of Human Serum Lipoproteins", *FEBS-Letters* 129/1 (1981), pp.1-4

81. BOEHRINGER Mannheim GmbH : "Harnanalyse mit Teststreifen - eine wissenschaftliche Produktinformation
82. BOEHRINGER Mannheim GmbH : "Kleine Teststreifen-Fibel", erschienen in der Schriftenreihe "Diagnostica Boehringer Mannheim" 1977
83. BOEHRINGER Mannheim GmbH : "Combur-9-Test - Neunfach-Teststreifen zur Bestimmung von Leukozyten, Nitrit, pH, Eiweiß, Glucose, Keton, Urobilinogen, Bilirubin und Blut im Harn" - Gebrauchsanleitung

84. BOEHRINGER Ingelheim Diagnostica : "Photometrische Bestimmung von Kreatinin in Serum, Plasma und Urin" - ingotest 565151 - Gebrauchsanleitung

85. Träxler, G.: "Schnelle Kinetik in der klinischen Chemie - neue Anwendungsmöglichkeiten von Mikroprozessoren", Report 1/1979, pp. 1-4
86. Träxler, G.: "Kinetische Nephelometrie", *medizin-technik*, Jg. 99, Heft 3 (1979), pp. 79-84
87. Träxler, G.: "Nephelometric Inhibition - eine Steigerung der Empfindlichkeit der kinetischen Nephelometrie", Report 2/1980

III. Diabetische Nephropathie

88. Baldamus, C. A.: "Diabetische Nephropathie", *Therapiewoche* 36 (1986), pp. 439-452
89. Brenner, B. M.; Hostetter, T. H.; Olson, J. L, et al.: "The role of glomerular hyperfiltration in the initiation and progression of diabetic nephropathie", *Acta Endocrinologia*, Suppl.242 (1981), pp. 7-10
90. Clavarella, A.; Flammini, M.; Stefoni, S. et al.: "Kidney Function After Improved Metabolic Control in Newly Diagnosed Diabetes and in Diabetic Patients with Nephropathy", *Diabetes Care*, Vol. 5/6 (1982), pp. 624-629
91. Christiansen, J. S.; Frandsen, M.; Parving, H.H.: "The Effect of Intravenous Insulin Infusion on Kidney Function in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus", *Diabetologia*, 20 (1981), pp. 199-204
92. Christiansen, J. S.; Gammelgaard, J.; Frandsen, M.: "Increased Kidney Size, Glomerular Filtration Rate and Renal Plasma Flow in Short-Term Insulin-Dependent Diabetics", *Diabetologia*, 20 (1981), pp. 451-456
93. Helber, A.: "Renovaskuläre Hypertonie, Nierenarterienstenose und verwandte Krankheitsbilder: ... Diabetische Nephroangiopathie" aus: Siegenthaler et al.: "Lehrbuch der Inneren Medizin", G. Thieme Verlag Stuttgart-New York, pp. 5.29-5.30
94. Michael, F. A.; Brown, D. M.: "Increased Concentration of Albumin in Kidney Basement Membranes in Diabetes Mellitus", *Diabetes*, Vol. 30 (1981), pp. 843-846
95. Mogensen, C. E.: "Progression of Nephropathy in Long-Term Diabetes with Proteinuria and Effect of Initial Anti-Hypertensive Treatment", *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 36 (1976), pp. 383-388
96. Mogensen, C. E.: "Renal Function Changes in Diabetes", *Diabetes*, 25 (1976), pp. 872-879
97. Mogensen, C. E.; Østerby, R.; Gundersen, H.J.G.: "Early Functional and Morphologic Vascular Renal Consequences of the Diabetic State", *Diabetologia*, 17 (1979), pp. 71-76
98. Mogensen, C. E.: "Pathophysiological and Clinical Manifestations of Renal Disease in Diabetes", *Proc. 8th Congr. Nephrol. Athens*, 7.-12.06.1981
99. Mogensen, C. E.; Steffes, M. W.; Deckert, T. et al.: "Functional and Morphological Renal Manifestations in Diabetes Mellitus", *Diabetologia*, 21 (1981), pp. 89-93

100. O'Hare, J. A.; Ferriss, J. B.; Twomey, B.: "Poor Metabolic Control, Hypertension and Microangiopathy Independently Increase the Transcapillary Escape Rate of Albumin in Diabetes", *Diabetologia*, 25 (1983), pp.260-263
101. Parving, H. H.; Andersen, A. R.; Smidt, U. M. et al.: "Reduced Albuminuria During Early and Aggressive Antihypertensive Treatment of Insulin-dependent Diabetic Patients with Diabetic Nephropathy", *Diabetes Care*, Vol.4/4 (1981), pp. 459-463
102. Parving, H. H.; Andersen, A. R.; Smidt, U. M. et al.: "The natural course of glomerular filtration rate and arterial blood pressure in diabetic nephropathy, and the effect of antihypertensive treatment", *Acta Endocrinologia*, Suppl. 242 (1981), pp. 39-40
103. Petrides, P.; Weiss, L.; Löffler, G.; Wieland, O. W.: "Diabetes Mellitus", Urban und Schwarzenberg München-Berlin-Wien (3. Aufl.) (1976), pp. 77-79
104. Poortmans, J.; Dorchy, H.; Toussaint, D.: "Urinary Excretion of Total Proteins, Albumin, and Λ_2 -Microglobulin During Rest and Exercise in Diabetic Adolescents With and Without Retinopathy", *Diabetes Care*, Vol. 5/6 (1982), pp. 617-623
105. Quellhorst, E.: "Symptomatik und Therapie der diabetischen Nephropathie - die Hypertoniegefahr muß gebannt werden", *Klinikarzt*, 15/5 (1986), pp. 309-315
106. Viberti, G. C.; Jarrett, R. J.; McCartney, M. et al.: "Increased Glomerular Permeability to Albumin Induced by Exercise in Diabetic Subjects", *Diabetologia*, 14 (1978), pp. 293-300
107. Viberti, G. C.; Keen, H.; Pickup, J. C. et al.: "Proteinuria and Diabetic Control in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus", *Acta Endocrinologia*, Suppl. 242 (1981), pp. 59-60
108. Viberti, G. C.; Keen, H.: "The Patterns of Proteinuria in Diabetes Mellitus", *Diabetes*, Vol.33 (1984), pp. 686-692
109. Vlassara, H.; Brownlee, M.; Cerami, A.: "Assessment of Diabetic Control by Measurement of Urinary Glycopeptides", *Diabetologia*, 23 (1982), pp. 252-254
110. Watkins, P. J.: "ABC of Diabetes - Nephropathy", *Brit. Med. J.*, 285 (1982), pp. 627-629

IV. Ischämische Nierenschädigung/Nierenphysiologie

111. Angielski, S.; Pawelczyk, T.; Bizon, D. et al.: "Differences in Adenylate Metabolism in Renal Cortex and Medulla", J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Vol. 24/9 (1986), p. 672
112. Bohle, A.: "Niere und harnableitende Organe: ... IV. Tubulopathien: Akutes Nierenversagen - ischämische Tubulopathie", aus: Eder, M./Gedigk, P.: "Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie", (30. Aufl.) Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1977, pp. 656-659
113. Coulson, R.: "Metabolism and Excretion of Exogenous Adenine 3':5'-monophosphate and Guanosine 3':5'-monophosphate", J. Biol. Chem., Vol. 251 (1976), pp. 4958-4967
114. Dienemann, H.; Hesse, U.; Brechtelsbauer, H. et al.: "Ischaemic Renal Failure in Conscious Dogs: Enhanced Recovery With ATP-MgCl₂ and Adenosine", XIX. Congress E.S.S.R. Zürich, Schweiz, 1984
115. Dienemann, H.; Hesse, U.; Brechtelsbauer, H. et al.: "Postischämisches Nierenversagen beim wachen Hund: Beschleunigte Erholung nach Adenosintriphosphat-Magnesiumchlorid-Infusion", 101. Kongreß der Dt. Gesellschaft für Chirurgie, München 25.-28.04.1984
116. Dienemann, H.; Hesse, U.; Brechtelsbauer, H. et al.: "Ischämisches Nierenversagen beim wachen Hund: Beschleunigte Erholung mit Adenosintriphosphat-Magnesiumchlorid (ATP-MgCl₂)", 25. Jubiläumstagung der Österreichischen Gesellschaft für Chirurgie und der ihr assoziierten Fachgesellschaften, Graz 21.-23.06.1984
117. Dienemann, H.; Hesse, U.; Brechtelsbauer, H. et al.: "Beschleunigte Erholung vom postischämischen Nierenversagen beim wachen Hund nach ATP-MgCl₂-Infusion", aus: "Chirurg. Forum '84 f. experim. u. klin. Forschung" (Hrsg.: L. Koslowski), Springer Verlag Berlin-Heidelberg 1984, pp. 7-10
118. Dienemann, H.; Hesse, U.; Thureau, K.: "Experimentelles postischämisches Nierenversagen: Beschleunigte Erholung mit Adenosin-Triphosphat und Adenosin", 6. Intern. Symp. f. Anästhesie- und Intensivbehandlungsprobleme, Flims-Waldhaus (Schweiz), 9-16.03.1985
119. Finkelstein, S. D.; Gilfor, D.; Farber, J. L.: "Alternations in the metabolism of lipids in the ischemia of the liver and the kidney", J. Lipid Research, Vol. 26 (1985), pp. 726-734

120. Gaudio, K. M.; Taylor, M. R.; Chaudry, I. H. et al.: "Accelerated recovery of single nephron function by the postischemic infusion of ATP-MgCl₂", *Kidney International*, Vol. 22 (1982), pp. 13-20
121. Gaudio, K. M.; Ardito, T. A.; Reilly, H. F. et al.: "Accelerated Cellular Recovery After an Ischemic Renal Injury", *Am. J. Pathol.*, 112 (1983), pp. 338-346
122. Siegel, N. J.; Glazier, W. B.; Chaudry, I. H. et al.: "Enhanced recovery from acute renal failure by the postischemic infusion of adenine nucleotides and magnesium chloride in rats", *Kidney International*, Vol. 17 (1980), pp. 338-349
123. Weidemann, J.; Hans, D. A.; Krebs, H. A.: "Effects of Adenine Nucleotides on Renal Metabolism", *Nephron*, Vol. 6 (1969), pp. 282-296

V. Lehrbücher und Nachschlagewerke

124. Buddecke, E.: "IX. Lipide - ... 10. Sphingolipide" aus: E. Buddecke: "Grundriss der Biochemie" (6. Aufl.), W. DeGruyter Berlin-New York 1980, pp. 229-232
125. Guder, W. G.: "Niere" aus: Greiling, H./ Gressner, A.: "Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie", F. K. Schattauer Verlag Stuttgart-New York 1986 (in Vorbereitung)
126. Harth, O.: "Nierenfunktion - ... Der glomeruläre Filtrationsprozeß", aus: Schmidt, R. F. / Tews, G.: "Physiologie des Menschen" (20. Aufl.) Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1980, pp. 675-679
127. Pavan-Langston, D.: "Manual of Ocular Diagnosis and Therapy", Little Brown and Company, Boston 1980, pp. 241-242 (Mucopolysaccharidosen) pp. 243-244 (Gangliosidosen)
128. Enzyme Nomenclature, Recommendations (1978) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, Academic Press New York-San Francisco-London 1979

VI. Statistik

129. Dokumenta Geigy - Wissenschaftliche Tabellen, (6. Aufl.), J. R. Geigy S. A. Basle, Switzerland 1962
130. Gerhardt, W.: "Zur Auswertung klinisch-chemischer Testdaten aus klinischen Studien", veröffentlicht in: "Dt. Ges. f. Klin. Chemie e.V. - Mitteilungen", 5/86 (1986), Demeter Verlag, D-8032 Gräfelfing, pp. 262-267
131. Immich, H.: "Medizinische Statistik - Eine Einführungsvorlesung", F. K. Schattauer Verlag Stuttgart-New York 1974, pp. 318-322 und 327-332 (Wilcoxon-Tests f. den Vergleich gepaarter Meßwerte bzw. zweier unabhängiger Stichproben) und pp. 363-364 (Variationskoeffizient)
132. Keller, H.: "Krankheits - Früherkennung und Entscheidungsgrenzen von klinisch-chemischen Tests", Vortrag gehalten 1985 auf der Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Klinische Chemie in Mannheim, veröffentlicht in: "Dt. Ges. f. Klin. Chemie e.V. - Mitteilungen", 1/86 (1986), Demeter Verlag, D-8032 Gräfelfing, pp. 2-8
133. Sachs, L.: "Angewandte Statistik", (6. Aufl.) Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo 1984
134. Stamm, D.: "Qualitätskontrolle klinisch-chemischer Analysen - Ein Lehrprogramm in 5 Lektionen für medizinisch-technische Assistenten, Studenten, Ärzte", G. Thieme Verlag Stuttgart 1972, pp. 70, 127

H. Anhang

Reagenzien - Materialien - Geräte

I. Reagenzien und Materialien:

Sephadex-G-25-M-Fertigsäulen	Pharmacia Fine Chemicals AB S-751 82 Uppsala, Schweden
p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-Glucosaminid; Sigma N 9376	Sigma Chemie 8024 München-Deisenhofen, BRD
2-Amino-2-methyl-1-Propanol	EGA Chemie Steinheim/Albuch, BRD
D/L-Alanin-p-nitroanilid Serva: 11 485	Serva Feinbiochemica GmbH 6900 Heidelberg, BRD
Kreatinin-ingo-Test 565651	Boehringer Ingelheim Diagnostica 8046 Garching b. München, BRD
Combur-9-Teststreifen	Boehringer Mannheim GmbH 6800 Mannheim 31, BRD
Hämoglobin-A-1c-Säulentest	BIO-RAD Laboratories GmbH 8000 München 50, BRD
Jenaer Glaswaren	Fa. Schott 6500 Mainz, BRD

II. Geräte:

Zentrifuge 3200	Fa. Eppendorf
Photometer 1101 M	2000 Hamburg, BRD
Thermostat 3401	
Rotationsmischer 3300	

Hettich Rotixa
Standardzentrifuge

pH-Meter

Waage Mettler P 160
Analysenwaage Typ H 15

ICS-Rate-Nephelometer
ICS-Immun-Chemie-System

Taschenrechner TI 25

Fa. Hettich
7200 Tübingen, BRD

Fa. Püsl
8000 München 2, BRD

Fa. Spoerhase Ag.
6300 Gießen, BRD

Beckmann Instruments GmbH
8000 München 40, BRD

Texas Instruments
8050 Freising, BRD

Lebenslauf

Cornelia Henrietta Preuss

geb.: 23.01.1960 in Boston, Mass. USA

Staatsangehörigkeit: deutsch, USA

Adresse: Schäftlarnweg 36
8021 Icking-Irschenhausen/Isartal

Eltern: Dr. med. Wilfriede Preuss

geb. Schwinger

Ärztin f. Innere Medizin

Dr. med. Hans-Günther Preuss

Arzt f. Psychiatrie

(Psychotherapie und
Psychoanalyse)

Brüder: Hans-Christoph Preuss

Thomas Carl Preuss

1961: Übersiedelung nach Deutschland,

zuerst nach Türkheim/Wertach (1961-62)

später Dorfen (1962-66) und Irschenhausen (ab 1966)

Schullaufbahn und Berufsausbildung:

1966 - 1970: Grundschule Icking
1970 - 1972: Gymnasium Icking
1972 - 1979: Gymnasium der Gesamtschule Geretsried
(Abitur Mai 1979)

April/Mai 1980: Immatrikulation und Beginn des Studiums der
Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität, München

März 1982: Ärztliche Vorprüfung

März 1983: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

März 1985: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

März 1986: 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

und Erhalt der Approbation als Arzt (9.05.1986)

